

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi**

**Ciclo XXIII**

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza:  
Vet/05**

**TITOLO TESI  
CONTROLLO DELLA SCRAPIE CLASSICA IN ITALIA:  
STRATEGIE DI SELEZIONE GENETICA A  
CONFRONTO**

**Presentata da: Francesca Baldinelli**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Giovanni Poglayen**

**Relatore**

**Prof. Fabio Ostanello**

**Correlatore**

**Dott.ssa Gaia Scavia**

**Esame finale anno 2011**

Certo, sopprimendo la causa si sopprime l'effetto, ma sopprimere i fiori appassiti non significa solo togliere sporcizia (rendere pulito),  
significa anche opprimere i frutti, dunque i semi.

Ora, è proprio nei semi che si trova l'essenza del messaggio  
biologico, quello che genera un ordine dinamico, portatore di  
giardini sconosciuti.

Gilles Clément  
*da Il giardino in movimento*

## Sommario

Riassunto	4
I - Introduzione	7
1.1 Introduzione alla malattia .....	7
1.2 Suscettibilità genetica degli ovini alla scrapie classica.....	11
1.3 Piani di controllo e eradicazione della scrapie classica .....	17
1.4 Piani di selezione genetica per la resistenza alle EST negli ovini .....	24
II. Obiettivo	28
2.1 Popolazione ovina italiana .....	29
2.2 Cenni di modelli di dinamica di diffusione <i>SIR</i> .....	32
III. Materiali e metodi	38
3.1 Introduzione al modello .....	38
3.2 Modello genotipico di popolazione .....	40
3.2.1 Razionale.....	40
3.2.2 Struttura.....	41
3.2.3 Dati e fonti dati .....	41
3.3 Modello di trasmissione tra animali.....	45
3.3.1 Razionale.....	45
3.3.2 Struttura.....	46
3.3.3 Dati e fonte dati.....	49
3.4 Modello di trasmissione tra allevamenti .....	54
3.4.1 Razionale.....	54
3.4.2 Struttura.....	55
3.4.3 Dati e fonte dati.....	56
3.5 Analisi della sensibilità .....	58
IV - RISULTATI	61
4.1 Modello .....	61
4.1.1 Tempi di eradicazione della scrapie nei diversi scenari selettivi (Output) .....	61
4.1.2 Efficacia di eradicazione della scrapie nei diversi scenari selettivi (Outcome).....	67
4.2 Analisi di sensibilità.....	72
V - Discussione	75
VI - Appendice	83
VII - Bibliografia	90

## Riassunto

La scrapie è una malattia infettiva degli ovi-caprini appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) anche note come malattie da prioni, che includono tra le altre, la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) nell'uomo, l'Encefalopatia Spongiforme bovina (BSE) nei bovini e la Chronic Wasting disease (CWD) nei cervidi. Le EST sono malattie neurodegenerative ad esito costantemente letale, il cui evento patogenetico chiave risiede nella trasformazione post trasduzionale di una proteina di membrana codificata dall'ospite, detta proteina prionica ( $\text{PrP}^c$ ), nell'isoforma patologica responsabile dei processi degenerativi ( $\text{PrP}^{\text{sc}}$ ). La manifestazione clinica della scrapie è il risultato di una complessa interazione tra l'agente infettante, del quale sono noti numerosi ceppi che differiscono tra loro per proprietà biochimiche, caratteristiche istopatologiche, sintomatologia ed epidemiologia e le caratteristiche dell'ospite, soprattutto riguardo il genotipo del gene codificante la proteina prionica (*Prnp*). Negli ovini, infatti, è noto che il *Prnp* presenta numerosi polimorfismi, ai quali sono associati diversi gradi di suscettibilità alla malattia. I polimorfismi più rilevanti nel determinismo genetico della scrapie sono quelli ai codoni 136, 154 e 171 dai quali derivano i cinque alleli ARQ, VRQ, AHQ, ARR, ARH. Tra questi, gli alleli VRQ e ARQ sono risultati associati alla suscettibilità alla scrapie, l'allele ARR a resistenza, gli altri a suscettibilità intermedie. Nella popolazione italiana è stato inoltre dimostrato come anche gli aplotipi  $\text{AT}_{137}\text{RQ}$ ,  $\text{AF}_{141}\text{RQ}$  e  $\text{ARQK}_{176}$  risultino associati ad una condizione di resistenza i primi e di suscettibilità l'ultimo.

La scrapie, pur essendo conosciuta da oltre due secoli soprattutto per le ingenti perdite economiche di cui è causa, negli ultimi tempi ha destato un crescente interesse in quanto potenziale agente di zoonosi. La Comunità Europea, a seguito dell'evidenza nel 1997 che la nuova variante CJD umana fosse legata all'esposizione all'agente della BSE ha posto l'attenzione sulla possibilità che la BSE potesse circolare nella popolazione ovina in una forma clinicamente indistinguibile dalla scrapie e ha reso obbligatori, per ciascuno Stato membro, programmi di sorveglianza della malattia sia attiva che passiva (Regolamento 999/2001/CE). In Italia, le attività di sorveglianza mostrano che nella popolazione ovina circoli un unico ceppo di scrapie classica che presenta uno target genotipico d'ospite specifico.

Il lungo periodo di incubazione, comune a tutte le EST, che spesso corrisponde o supera la vita commerciale degli ovini, l'assenza di un test diagnostico *ante-mortem* e alcuni attributi della sorveglianza stessa rendono inefficaci gli interventi di controllo e gestione tradizionalmente adottati nei confronti degli agenti di malattie infettive. Per tale motivo l'Unione Europea ha adottato misure di controllo della scrapie negli ovini, basate su programmi volti a selezionare popolazioni geneticamente resistenti alle EST (Regolamento 999/2001/CE). Obiettivo dei programmi di selezione genetica è quello di ridurre, nella popolazione ovina, la frequenza dei portatori di alleli  $\text{PrP}$  associati ad alta suscettibilità alla scrapie (VRQ), e di incrementare la frequenza degli alleli di resistenza (ARR).

Obiettivo della presente tesi è stato stimare l'efficacia di diverse strategie di selezione genetica per incrementare la proporzione di capi portatori dei genotipi  $\text{PrP}$  associati a resistenza alla scrapie classica, nella popolazione ovina nazionale al fine di eradicare la malattia in Italia. La condizione di eradicazione è stata verificata tramite il calcolo del numero riproduttivo di base ( $R_0$ ), parametro il cui valore quantifica la diffusione di una malattia nella popolazione ospite e gli sforzi necessari per interromperla. A tal fine è stato sviluppato un modello matematico che ha simulato la diffusione della scrapie nella popolazione ovina italiana in un periodo di tempo di 50 anni e che ha restituito il valore che  $R_0$  assume all'inizio della selezione riproduttiva e durante la sua applicazione.

Il modello ha combinando insieme le numerosi variabili - relative all'agente e all'ospite - che permettono di riprodurre la dinamica dell'infezione nella popolazione e di cogliere gli elementi indispensabili a descrivere l'andamento del piano di selezione genetica nella popolazione. Esso risulta strutturalmente costituito da tre componenti: un *modello genotipico di popolazione*, deterministico e discreto che ha stimato la distribuzione nel tempo dei genotipi della PrP nella popolazione ovina, a partire da frequenze genotipiche note e in funzione della strategia riproduttiva adottata e delle caratteristiche demografiche e riproduttive della popolazione ovina; un *modello di diffusione della scrapie intra-allevamento* deterministico e eterogeneo per classi di rischio genotipico, che ha stimato la trasmissione della malattia tra gli animali; un *modello di diffusione della scrapie tra allevamenti*, che ha valutato la diffusione della malattia tra allevamenti ovin, in funzione del grado di adesione degli allevatori ai piani di selezione genetica e della prevalenza iniziale della scrapie tra allevamenti. Affinché il modello riproducesse l'epidemiologia della scrapie nel contesto italiano, le informazioni che lo hanno alimentato sono derivate dai dati reali di diffusione della malattia nella popolazione ovina nazionale ed è stato applicato a tre distinte popolazioni ovine. La prima è costituita da animali di razza Sarda e rappresenta oltre la metà del patrimonio ovino nazionale, la seconda, scelta con l'intento di rappresentare una più ampia proporzione di popolazione è costituita da individui di razza Sarda misti a ovin meticc e l'ultima dagli ovin italiani di razza Bergamasca, per esplorare una condizione di selezione caratterizzata da frequenze genotipiche differenti dalle condizioni esplorate nelle due popolazioni precedenti.

Si è pertanto valutato se alcune strategie di riproduzione degli ovin fossero efficaci quanto la strategia riconosciuta dal mondo scientifico e dalla CE quale la più efficace nell'eradicare la scrapie, sotto diversi scenari di diffusione iniziale della malattia e sotto diverse ipotesi di adesione degli allevatori ai piani di selezione.

Le strategie riproduttive testate hanno compreso l'analisi dell'evoluzione naturale della malattia senza alcun intervento selettivo specifico per la PrP e l'andamento della malattia in conseguenza dell'applicazione delle norme minime della selezione previste dall'Unione Europea. Inoltre si è valutata e confrontata l'efficacia dei piani di selezione genetica della PrP implementati sul territorio nazionale (D.M. 17/12/2004) e di alcune strategie che hanno utilizzato in selezione tutti i genotipi PrP che hanno dimostrato di conferire resistenza alla scrapie negli ovin italiani e presenti nella popolazione con frequenze non trascurabili.

Il modello ha dimostrato come l'andamento della Scrapie in assenza d'interventi sia endemico in Italia e come l'applicazione della norme selettive minime richieste dalla CE non porti all'eliminazione della malattia dal territorio nazionale, indipendentemente dalle condizioni di prevalenza iniziale della malattia e di compliance ipotizzate. La condizione di selezione indispensabile al fine di eradicare la scrapie è risultata essere l'esclusione di arieti con l'allele ARQ<sub>sus</sub> dalla riproduzione. La strategia che seleziona la popolazione ovina con arieti omozigoti per l'allele ARR si è dimostrata complessivamente la più efficace, in termini di tempo, nell'eradicare la malattia ma anche le strategie che operano la selezione utilizzando arieti con almeno un allele resistente quale l'ARR o l'ARQ<sub>res</sub> hanno mostrato, in relazione alle condizioni di prevalenza iniziale tra allevamenti e di compliance, di essere ugualmente efficaci. Tali strategie selettive, alternative a quella identificata a livello europeo e nazionale come la strategia di preferenza, presentano il vantaggio di mantenere nella popolazione una più ampia variabilità genotipica, che rappresenta una buona difesa da eventuali ceppi di scrapie, già circolanti o di nuova emersione, che potrebbero diffondersi nel nostro Paese.

Inoltre per poter fare previsioni a lungo termine su quali siano gli sforzi necessari per eliminare la scrapie appare di cruciale importanza stimare la reale prevalenza della malattia sul territorio. Questa informazione è indispensabile per poter valutare quali strategie selettive risultino efficaci e quale sia il grado di adesione degli allevamenti al piano necessario all'eradicazione della malattia.

In questo senso il modello si è dimostrato un utile strumento non solo per fare previsioni sulla base delle ipotesi di diffusione iniziale della malattia ma anche per indicare quali siano le informazioni che vanno raffinate o conosciute meglio per fare previsioni attendibili in termini di tempo necessario all'eradicazione e non solo di efficacia.

# I - Introduzione

## 1.1 Introduzione alla malattia

La scrapie è una malattia infettiva a carattere contagioso degli ovi-caprini, appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) anche note come malattie da prioni. Le EST sono malattie neurodegenerative ad esito invariabilmente letale che colpiscono il sistema nervoso centrale dell'uomo e di numerose specie animali.

Le EST possono avere origine sporadica, genetica o infettiva. Negli animali le forme infettive più comuni sono la Scrapie nei piccoli ruminanti (ovini e caprini), l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) dei bovini, la Chronic Wasting Disease (CWD) dei cervidi. Sono ritenute sporadiche alcune forme atipiche recentemente identificate di BSE (BSE-H e BSE-L) e di scrapie (Nor98). Nell'uomo si riconoscono diverse forme, sporadica, genetica e acquisita, della malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), la sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) di origine genetica, l'Insonnia Familiare Fatale di origine genetica e sporadica (FFI), e il Kuru di origine acquisita.

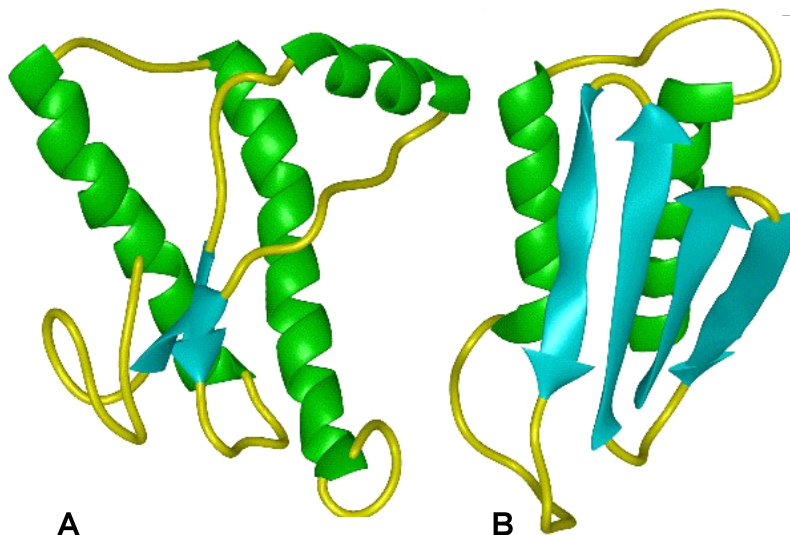
La scrapie, come tutte le EST, è una malattia neurologica progressiva caratterizzata da tempi di incubazione estremamente lunghi, che possono variare da parecchi mesi a 4-5 anni, manifestandosi in genere a 3-4 anni, raramente in animali di età inferiore a 2 anni (Di Guardo e Marcato, 2002). L'esordio della malattia è spesso subdolo e poco specifico ed è caratterizzata da un quadro clinico con una varietà di disturbi comportamentali e neurologici. Le prime manifestazioni cliniche consistono in genere in disturbi comportamentali caratterizzati da ipereccitazione, aggressività, nervosismo, paura, stato stuporoso e depressione del sensorio, cui fanno seguito progressivamente fenomeni di atassia locomotoria, che esitano a loro volta in una paralisi flaccida o spastica del treno posteriore (Ligios *et al.*, 1999; Di Guardo e Marcato, 2002). Un altro sintomo caratteristico della Scrapie ovina, seppure non patognomonico, risulta essere il prurito, che porta gli animali a grattarsi (da cui il nome della malattia che deriva dal verbo inglese *to scrape*).

Da un punto di vista patologico, le lesioni sono confinate a livello del sistema nervoso centrale (SNC), mostrano una caratteristica distribuzione bilaterale e simmetrica e sono apprezzabili solo istologicamente. Consistono in spongiosi del neuropilo, vacuolizzazione e perdita neuronale a livello del midollo allungato del ponte, del mesencefalo e del midollo spinale, iperplasia ed ipertrofia delle cellule gliali in assenza di reazioni infiammatorie e/o immunitarie.

L'evento patogenetico cruciale della scrapie, e comune a tutte le TSE è rappresentato dall'accumulo, a livello del SNC e di una serie di tessuti periferici, dell'isoforma patologica ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) di una proteina normalmente presente nell'ospite denominata "proteina prionica cellulare" ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), come depositi insolubili di proteine o placche amiloidi. La  $\text{PrP}^{\text{C}}$  è una glicoproteina di membrana codificata dal gene *PrnP* ed espressa in vari tipi cellulari inclusi neuroni, astrociti, microglia, oligodendroglia, leucociti e cellule muscolari (Hetz *et al.*, 2003). La localizzazione della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  nei sinaptosomi e la sua intima associazione con il rame in ambito presinaptico suggeriscono che essa possa svolgere un importante ruolo nella normale trasmissione nervosa (Collinge *et al.*, 1994; Hermes *et al.*, 1999), intervenendo pure nel metabolismo dell'ossido nitrico (Sorenson, 2001). Alcuni studi hanno inoltre documentato un'attività antiossidante e un importante ruolo biologico esplicito da tale proteina nel metabolismo del rame (Brown, 1999a,b; Aguzzi e Polymenidou, 2004), la cui omeostasi sarebbe da essa ripristinata in presenza di elevate concentrazioni di radicali liberi dell'ossigeno (Sakudo *et al.*, 2004).

Secondo la teoria prionica enunciata nel 1982 da Prusiner e ad oggi ancora la più accreditata, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  rappresenta l'agente responsabile delle EST (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998). nelle EST è rappresentato cruciale la modificazione conformazionale della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  nella isoforma patologica  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Pur mantenendo la stessa struttura primaria la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  acquisisce, a seguito di modificazioni post-translazionali, un più alto contenuto di foglietti beta ed un minor contenuto di alfa eliche che gli conferisce la capacità di aggregarsi in polimeri di varia misura (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner 1982; Prusiner, 1998) (figura 1.1.1). Accanto a queste modificazioni strutturali, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  possiede caratteristiche biochimiche che la rendono facilmente differenziabile dalla  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , in particolare essa è insolubile in detergenti e parzialmente resistente al trattamento con proteasi K.





**Figura 1.1.1** – A. Struttura della proteina prionica cellulare (PrPC ) con 4  $\alpha$  -eliche; B. Struttura della proteina prionica patogena (PrPSc ) con 2  $\alpha$  -eliche e 4  $\beta$  -foglietti.

Sottoposta all'azione della proteinasi K, la PrP<sup>Sc</sup> viene parzialmente degradata e la molecola che ne deriva, polimerizzando, dà luogo alle fibrille amiloidee denominate “Scrapie-Associated Fibrils” (SAF) che si organizzano in depositi presenti a livello cerebrale in tutte le EST umane ed animali (Prusiner, 1991).

Secondo Prusiner (1999) il processo replicativo dei prioni avverrebbe attraverso un meccanismo autocatalitico che indurrebbe l'isoforma normale della PrP a modificare la propria conformazione trasformandola in patogena. Alla base di questo processo replicativo sono stati ipotizzati due diversi meccanismi molecolari alla, entrambi assumono che una sequenza di aminoacidi sia capace di codificare almeno due conformazioni, in relazione alla propria complessità e all'ambiente circostante.

La teoria prionica di Prusiner, comprovata da numerose evidenze sperimentali (King e Diaz-Avalos 2004; Legname *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004) tra cui la resistenza alle EST osservata in topi transgenici privi della PrP (Büeler *et al.*, 1993) è attualmente l'ipotesi patogenetica universalmente accettata e avvalorata nella comunità scientifica, nonostante siano state elaborate nel tempo ipotesi alternative (Sigurdsson, 1954, Pocchiari, 1994).

La Scrapie ha una distribuzione cosmopolita, è considerata endemica nel Regno Unito ed in molti altri Paesi del mondo anche se risulta essere assente in Australia ed in Nuova Zelanda. Le prime notizie sulla scrapie risalgono al 1732 nel Regno Unito (Stamp, 1962) e per lungo tempo è rimasta l'unica EST conosciuta ed in quanto tale ritenuta il “prototipo” delle EST (Pocchiari, 1994; Prusiner, 1998). In Italia è stata segnalata per la prima volta in Piemonte nel 1976 in una pecora di razza Biellese (Cravero *et al.* 1977).

Nonostante la malattia sia nota da più di due secoli, le modalità di trasmissione tra animali non sono ad oggi perfettamente conosciute. Sembra che la via più probabile di ingresso sia quella orale, tramite l'ingestione di organi e tessuti infetti. E' dimostrata anche la trasmissione verticale in periodo prenatale, in seguito ad infezione diretta dell'oocellula oppure per via dia-placentare. L'infezione del neonato può anche verificarsi attraverso l'ingestione di colostro e latte (Konold *et al.*, 2008), oppure per contatto intimo con la madre. L'agente causale, oltre che attraverso la via orale, può infettare l'ospite anche attraverso lesioni cutanee (Taylor *et al.*, 1996). Inoltre è noto che l'agente della Scrapie può persistere per anni nell'ambiente contaminato che risulta essere una fonte d'infezione per gli ovini (Smith *et al.*, 2011).

Dopo una infezione per via orale, la patogenesi prevede una prima replicazione della PrP<sup>sc</sup> nel sistema linfatico associato alla parete dell'intestino tenue, e cui consegue una diffusione ad altri tessuti linfatici (Andreoletti *et al.*, 2000) e alla milza (Daude, 2004). Successivamente il prione raggiunge il SNC per via neurotrofa intra-assonale e/o per via ematogena (Di Guardo e Marcato, 2002).

L'agente causale può essere eliminato dagli animali infetti sia durante la lunga fase preclinica che durante la fase sintomatica dell'infezione. La placenta di pecore infette, che partoriscono sui pascoli, sembra rappresentare la principale fonte di infezione nei confronti di altri ovini (Andreoletti *et al.*, 2002; Lacroux, 2007), anche se si ritiene che feci, saliva, urine, colostro, latte e sangue possano anch'essi contenere infettività (Detwiler e Baylis, 2003).

Uno degli aspetti più controversi delle EST è che meno si concilia con la teoria prionica, è l'esistenza di ceppi diversi di agente ovvero di isolati infettivi che, quando propagati nello stesso ospite, esibiscono distinti fenotipi di malattia che persistono anche dopo trasmissioni seriali (Fraser e Dickinson, 1973; Bruce *et al.*, 1991). I ceppi vengono tradizionalmente tipizzati sulla base delle caratteristiche cliniche e patologiche della malattia indotta in topi sperimentalmente inoculati con l'isolato da caratterizzare (Fraser e Dickinson, 1968) o con un approccio di tipo molecolare, sulla base della struttura tridimensionale e delle proprietà biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> (7-12).

Studi di caratterizzazione molecolare supportano l'ipotesi che distinti ceppi di EST siano associati a differenze nella conformazione (Telling *et al.*, 1996) del prione, nel profilo di glicosilazione della PrP<sup>Sc</sup>, nel grado di proteasi-resistenza e nello stato di aggregazione (Horiuchi *et al.*, 1999).

Il fenomeno della variabilità di ceppo è stato particolarmente studiato rispetto all'agente della scrapie ma esistono evidenze dell'esistenza di ceppi diversi dell'agente anche nel caso di

altre EST, quali la CJD (Kitamoto *et al.*, 1990), l'encefalopatia trasmissibile del visone (Kimberlin *et al.*, 1986) e la BSE (base Casalone *et al.*, 2004). Le prime evidenze sul fatto che la scrapie potesse essere causata da diversi agenti di EST risalgono agli anni '50 (Pattison and Millson, 1961) e ad oggi sono numerosi i ceppi caratterizzati nel topo, anche se rimangono oscuri i rapporti che legano i ceppi di scrapie adattati ai roditori e quelli dell'ovino (González *et al.*, 2006).

Recentemente sono state identificate forme atipiche di scrapie, provocate da ceppi prionici caratterizzati da fenotipi immunobiochimici della PrP<sup>sc</sup> diversi da quello classico. Tale forma di malattia, identificata per la prima volta nel 1998 in una pecora norvegese, è stata denominata Scrapie Nor 98 (Benestad *et al.*, 2003). In seguito, numerose altre segnalazioni di casi di scrapie atipica sono state diagnosticate in altri Paesi europei tra cui Francia, Portogallo, Germania, Regno Unito e Italia, mostrando come fossero molto più comuni di quanto si pensasse. La Scrapie atipica differisce dalla forma classica per diversi aspetti. Sono note differenze sostanziali per quanto riguarda l'epidemiologia, la clinica, le caratteristiche immuno-istochimiche delle lesioni. In particolare interessa animali con genotipi diversi da quelli colpiti dalla scrapie classica, tra cui ovini con l'allele resistente ARR sia in eterozigosi che in omozigosi (Benestad *et al.*, 2008). L'incidenza molto bassa con cui la scrapie Nor 98 si presenta all'interno del gregge, dove generalmente colpisce un solo animale, fa pensare che non abbia una origine infettiva come la scrapie classica, ma che possa trattarsi di una forma sporadica (Fediaevsky *et al.*, 2010).

## **1.2 Suscettibilità genetica degli ovini alla scrapie classica**

E' noto come la manifestazione clinica della scrapie sia fortemente influenzata sia dall'agente infettante, ceppo prionico, che dalla suscettibilità genetica dell'ospite. L'esistenza di fattori genetici coinvolti nella modulazione della suscettibilità alla scrapie è nota già dagli anni sessanta quando fu considerata come appartenente ad "una speciale categoria di disordini genetici in cui l'azione fisiologica di un gene è mediata da una particolare particella con caratteristiche proprie di auto-replicazione e patogenicità" (Parry *et al.*, 1962). Nei prim; Prusiner *et al.*, 1983) e la scoperta che essa fosse codificata da un gene dell'ospite (Oesch *et al.*, 1985) aprirono la strada alla comprensione della patogenesi delle malattie da prioni e allo studio dei fattori genetici in causa.

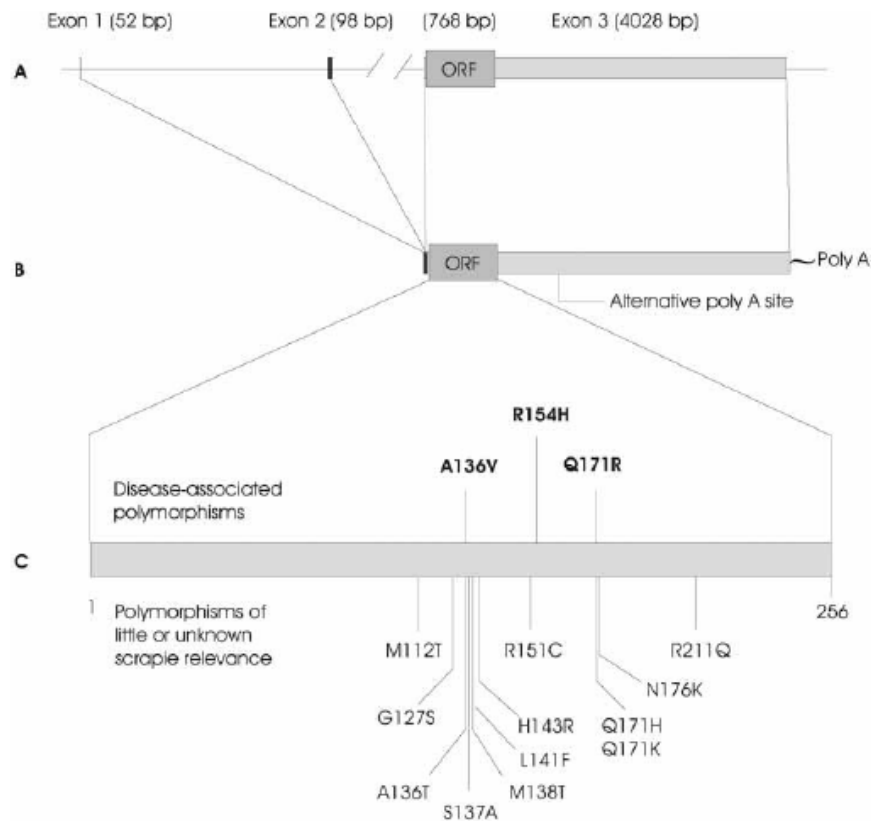
Sono stati identificati diversi polimorfismi specifici nella regione codificante la proteina prionica del gene *Prnp*, che hanno consentito di spiegare la variabilità osservata da tempo

nella suscettibilità degli ovini alla scrapie. Il *Prnp*, presente in tutti i mammiferi (Baylis e Goldmann, 2004) negli ovini è localizzato sul cromosoma 13 ed è costituito da tre esoni (separati da due introni), sull'ultimo dei quali è presente la sequenza codificante la PrP<sup>c</sup> (ORF) (figura 1.2.1) (Tranulis 2002).

La PrP<sup>c</sup> risulta costituita da 256 amminoacidi, 39 dei quali sono ad oggi risultati polimorfici e danno vita a 44 possibili varianti alleliche riscontrate negli ovini (Goldman, 2008). Tuttavia i polimorfismi maggiormente coinvolti nel modulare la suscettibilità alla malattia sono quelli osservati ai codoni 136, 154 e 171 del gene *Prnp* (Goldmann *et al.*, 1990, Goldmann *et al.*, 1991, Tranulis *et al.*, 1999).

L'allele ARQ, il quale presenta al codone 136 l'amminoacido alanina (A), al codone 154 arginina (R) e al codone 171 glutammina (Q) è considerato l'allele ancestrale. Le sostituzioni amminoacidiche A136V, R154H, Q171R/H generano diverse forme alleliche (VRQ, AHQ, ARR, ARH) che conferiscono diversi gradi di suscettibilità alla malattia. L'allele VRQ è risultato chiaramente associato ad una condizione di suscettibilità alla scrapie mentre l'allele ARR a resistenza (Belt *et al.*, 1995; Hunter *et al.*, 1996; Elsen *et al.*, 1999).

Sono possibili numerose sostituzioni amminoacidiche che generano altri alleli quali ad esempio TRQ, ARK e ALQ, i quali sono però molto rari nella popolazione ovina (Acin *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2006; Billinis *et al.*, 2004) e per tale motivo risulta difficoltoso valutarli rispetto al ruolo che potrebbero avere nel determinismo genetico della malattia.



**Figura 1.2.1** - . A). Organizzazione del gene Prnp codificante la proteina prionica. L'*open reading frame* indicata come ORF è la regione codificante la PrP. C) I polimorfismi della PrP principalmente associati alla scrapie sono indicati al di sopra della proteina, mentre al di sotto della proteina vengono indicati alcuni tra i possibili altri polimorfismi per alcuni dei quali è stato dimostrato un ruolo nel determinismo genotipico della scrapie. A- alanina; C- cistina; F- fenilalanina; G- glicina; H- istidina; K- lisina; M- metionina; Q- glutammina; R- arginina, S- serina; T- treonina; V- valina. (Tranulis 2002).

La combinazione degli alleli ARQ, VRQ, AHQ, ARR, ARH restituisce quindici genotipi, diversamente legati alla modulazione della suscettibilità all'infezione nell'ospite.

Il differente livello di protezione che ciascun genotipo conferisce o meno verso la malattia è stato diversamente indagato nel tempo con studi *in vivo*, indagini condotte in greggi naturalmente infetti e mantenuti in condizioni sperimentali e studi osservazionali di popolazione.

Hunter (1996) osserva come la sopravvivenza degli ovini VRQ/VRQ fosse inferiore rispetto ad animali ARQ/VRQ e come questa aumentasse in ovini con sostituzioni (rispetto all'allele ancestrale) al 154 e 171, mentre animali ARR/VRQ fossero resistenti alla malattia. Il riscontro sistematico della malattia in tutti gli ovini VRQ/VRQ prima dei due anni di età suggerì che si trattasse in realtà di una malattia genetica, ipotesi poi scartata dalla elevata sopravvivenza (8-9 anni) mostrata da animali VRQ/VRQ in assenza di malattia (Hunter *et al.*, 1997).

Sulla base della sopravvivenza e dell'età di insorgenza dei sintomi di malattia diversi lavori hanno confermato, seppur con differenze dovute alle condizioni di studio e ai genotipi esaminati, una suscettibilità massima in ovini VRQ/VRQ, leggermente inferiore in animali ARQ/VRQ, più bassa o assente per ARQ/ARQ, ARQ/AHQ e VRQ/ARR e assente per ARQ/ARR, ARR/ARR (Houston *et al.*, 2002; Hunter, 2007; Elsen, 1999; Baylis *et al.*, 2002; Baylis e Goldmann, 2004; Hunter *et al.*, 1996).

Per animali ARQ/ARQ, appartenenti allo stesso gregge e della stessa razza, è dimostrato come la suscettibilità possa variare notevolmente in relazione al ceppo di scrapie responsabile dell'infezione rispetto ai quali tali ovini possono risultare resistenti o mostrare sintomi di malattia anche in un tempo piuttosto breve (circa 1 anno)(Goldman *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 2011 )

Uno studio più recente condotto per valutare la suscettibilità *in vivo* riporta i tempi di sopravvivenza minori in ovini ARQ/ARQ, seguiti da AHQ/ARQ, AHQ/AHQ, ARH/ARQ, ARH/AHQ mentre ovini eterozigoti per l'allele ARR non hanno ancora mostrato segni clinici d'infezione (Vaccari *et al.*, 2007).

Studi osservazionali condotti nella popolazione ovina generale hanno permesso di quantificare il rischio associato a ciascun genotipo tramite la sua misurazione indiretta come *Odds ratio* (OR) o semplicemente di valutare l'incidenza genotipo specifica dei casi.

In Gran Bretagna il tasso di attacco, quale stima grezza della suscettibilità genotipica, è risultato massimo per il VRQ/VRQ (545 casi per milione), seguito da ARH/VRQ, ARQ/VRQ, ARQ/ARQ (rispettivamente 405, 225 e 37 casi per milione) (Detwiler e Baylis, 2003; Baylis *et al.* 2004).

L'effetto sul tasso di attacco della presenza degli alleli AHQ e ARH risulta meno chiaro. Se infatti nei genotipi con ARH diversi da ARH/VRQ è complessivamente nell'ordine di qualche caso di malattia per milione e dimostra come tale allele conferisca resistenza, l'AHQ sembra smorzare in combinazione con il VRQ la suscettibilità di quest'ultimo anche se in condizioni di omozigosi presenta un tasso di attacco maggiore, probabilmente dovuto a distorsioni del campione (Detwiler e Baylis, 2003). Per i genotipi in cui è presente l'allele ARR il numero di casi appare irrilevante se non nullo (Detwiler e Baylis, 2003; Baylis *et al.*, 2004).

E' interessante confrontare le misure di rischio associate ai genotipi PrP che due studi di tipo caso-controllo condotti in Gran Bretagna e in Italia riportano prendendo entrambi come genotipo di riferimento ARQ/ARQ (Tongue *et al.*, 2006; Ciaravino, dati non pubblicati). Mentre nella popolazione inglese i genotipi VRQ/VRQ, ARQ/VRQ, ARH/VRQ hanno

mostrato un rischio di infezione da 20, nel caso del VRQ/VRQ, a 5 volte maggiore rispetto a quello di riferimento, nella popolazione italiana nessun genotipo ha mostrato un rischio di infezione superiore a quello dell'ARQ/ARQ. Concordano invece sull'effetto protettivo di ARR/ARR, ARR/ARH e AHQ/ARQ e in generale di quei genotipi che contengono l'allele ARR.

Secondo Cosseddu (2007) la suscettibilità del genotipo ARQ/ARQ sembra essere massima in quelle razze in cui non è presente o lo è scarsamente l'allele VRQ, situazione che sembra caratterizzare alcune razze presenti nell'area mediterranea per le quali i genotipi ARQ/ARQ e ARQ/AHQ rappresentano il target genotipico principale della scrapie. Ciò sembra dovuto non tanto a una loro elevata frequenza nella popolazione ovina quanto piuttosto a un reale più alta suscettibilità in relazione al particolare ceppo di scrapie circolante (Cosseddu *et al.*, 2007).

Nel Regno Unito, le numerose evidenze prodotte rispetto alla modulazione della suscettibilità/resistenza alla scrapie operata dai genotipi PrP hanno portato nel 2001 il DEFRA a elaborare una classificazione del rischio associato ai genotipi PrP. Tale classificazione è stata soggetta nel tempo a diverse revisioni sulla base delle nuove evidenze prodotte, soprattutto per quei genotipi considerati meno frequenti nella popolazione ovina e per i quali erano disponibili poche informazioni (tabella 1.2.1). L'intento principale è stato semplificare la lettura e la comprensione del ruolo svolto dai genotipi nella suscettibilità alla malattia per implementare misure di controllo della scrapie su base genetica nel contesto del *National scrapie plan* (NSP).

Genotype result	Type	Degree of resistance/susceptibility
ARR/ARR	1	Sheep that are genetically most resistant to scrapie.
ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	2	Sheep that are genetically resistant to scrapie, but will need careful selection when used for further breeding.
AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	3	Sheep that genetically have little resistance to scrapie and will need careful selection when used for further breeding.
ARR/VRQ	4	Sheep that are genetically susceptible to scrapie and should not be used for breeding unless in the context of a controlled breeding programme approved by NSPAC.
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	5	Sheep that are highly susceptible to scrapie and should not be used for breeding.

**Tabella 1.2.1** – Classificazione della suscettibilità dei genotipi PrP in 5 classi, secondo il NSP (2009).

Il sequenziamento dell'intero *Prnp* in ovini sia sani che con malattia ha permesso di evidenziare la presenza in soggetti ARQ/ARQ di mutazioni in codoni diversi da 136, 154 e 171. Per alcuni di questi aplotipi è stato possibile dimostrare, in virtù della frequenza non trascurabile con cui si presentano in alcune razze ovine, un ruolo nel determinismo genetico della scrapie, nello specifico per gli aplotipi AT<sub>137</sub>RQ, AF<sub>141</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub>.

In studi *in vivo* animali con gli alleli AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub> in combinazione tra loro o con l'ARQ o l'ARR non sembrano suscettibili alla scrapie dopo infezione per via orale (OS) ma anche per intracerebrale (IC) (Vaccari *et al.*, 2007); inoltre nella popolazione italiana non sono presenti in casi di malattia naturale (Vaccari *et al.*, 2001; Vaccari *et al.*, 2009). E' infatti dimostrato che tali alleli inducono un effetto protettivo negli ovini in condizioni naturali di occorrenza della malattia, ed è la prima volta che viene dimostrato l'effetto significativamente protettivo sul campo di alleli diversi dall'ARR (Vaccari *et al.*, 2009; Maestrale *et al.*, 2009). Nei casi naturali di malattia riportati da Vaccari (2009) sono presenti genotipi con l'allele AF<sub>141</sub>RQ ai quali è associato un effetto protettivo se comparato con ARQ, anche se di molto inferiore a quello dato da AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub>. Anche Maestrale (2009) riporta un effetto protettivo di AF<sub>141</sub>RQ rispetto a ARQ ma non significativo. Anche nello studio osservazionale, sempre condotto sulla popolazione italiana, i genotipi contenenti



il AF<sub>141</sub>RQ non sono risultati significativamente protettivi rispetto a ARQ/ARQ (Ciaravino, dati non pubblicati).

### **1.3 Piani di controllo e eradicazione della scrapie classica**

La scrapie, pur essendo da tempo nota per le ingenti perdite economiche di cui è causa, negli ultimi tempi ha però destato un crescente interesse tra gli operatori di sanità pubblica in quanto potenziale agente di zoonosi.

L'evidenza nel 1997 che la nuova variante di CJD umana (vCJD) (Wells *et al.*, 1987) fosse legata all'esposizione all'agente della BSE (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997), l'identificazione di due casi naturali di BSE in capre (Eloit *et al.*, 2005; Jeffry *et al.*, 2006; ) e la elevata trasmissibilità sperimentale di tutte le EST, l'hanno definitivamente posta non solo come un problema di sanità animale, ma anche come emergenza di sanità pubblica. Il mondo scientifico ha posto l'attenzione sulla possibilità che la BSE possa circolare nella popolazione ovina in una forma clinicamente indistinguibile dalla scrapie (Foster *et al.*, 1993). Inoltre non è escluso che la BSE nel salto di specie acquisisca caratteristiche di trasmissibilità tipiche della scrapie, che la renderebbero difficilmente controllabile nella popolazione ovina. Recentemente l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) hanno pubblicato un parere congiunto in cui si conduce una disamina delle ultime informazioni scientifiche disponibili sui possibili legami tra le EST negli animali e nell'uomo (EFSA, 2011). EFSA e ECDC esaminano in maniera critica gli studi e gli strumenti epidemiologici e di laboratorio per valutare un'eventuale associazione tra EST animali e umane e concludono che, se da un lato non sono state prodotte evidenze epidemiologiche che suggeriscono un potenziale zoonotico della scrapie (classica), dall'altro i dati prodotti da studi sperimentali di trasmissione condotti in primati e topi transgenici per la PrP umana sono troppo limitati per poter concludere che la malattia sia potenzialmente zoonotica.

Solo dopo la comparsa della BSE , sulla spinta di organismi internazionali quali l'OMS, la FAO e l'OIE, è stato istituito il Regolamento 999/2001/CE negli stati membri della Comunità Europea, recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune EST, quali la scrapie e la BSE. Già dell'inizio degli anni '90 la malattia era notificabile sulla base del sospetto clinico in alcuni Paesi europei, quali Regno Unito e Olanda, compresa l'Italia in cui l'obbligo di denuncia (DPR350/1954) è stato introdotto da una ordinanza del Ministro della sanità del 1991. L'identificazione dei casi di malattia era quindi condotta nell'ambito di

un sistema di sorveglianza passiva ovvero di notifica dei sospetti con sintomatologia neurologica.

Con il Regolamento 999/2001/CE la Commissione europea ha intrapreso un programma globale inteso a proteggere gli animali dai rischi correlati alle EST e i consumatori dal rischio BSE.

Introduce infatti misure di prevenzione basate su programmi annuali di sorveglianza sia attiva che passiva che ogni Stato membro ha l'obbligo di attuare, allo scopo di acquisire informazioni epidemiologiche sulla dinamica spazio-temporale delle EST nella popolazione ovina e caprina, di investigare i focolai di malattia rilevati dal sistema e di rilevare la BSE nei piccoli ruminanti (per scongiurare che casi di BSE nei piccoli ruminanti possano sfuggire al sistema e rappresentare un rischio per la salute dei consumatori).

Sono oggetto delle attività di sorveglianza passiva gli animali sospetti di infezione, e in questa categoria rientrano gli ovini macellati con urgenza, i sintomatici all'esame *ante mortem*, i morti e gli abbattuti in relazione a un caso di EST (macellati sani).

Le attività della sorveglianza attiva sono volte all'identificazione dei casi di malattia in tre categorie di animali: *regolarmente macellati* per il consumo umano; *non macellati per il consumo umano*, che includono principalmente i morti in allevamento; animali appartenenti a un *gregge infetto*. Il numero minimo di animali che ciascuno stato deve campionare e testare per la diagnosi di EST è stabilito sulla base della numerosità della popolazione ovina nazionale. Inoltre il campionamento deve essere rappresentativo della popolazione ovina nazionale e per tale ragione nel caso dell'Italia è stratificato sulla base delle consistenze regionali.

Tali emanazioni costituiscono la base per i Piani Regionali di sorveglianza delle EST in base ai quali ogni Regione deve sottoporre a prelievo un campione di ovini *regolarmente macellati* di età superiore ai 18 mesi, e un campione ovino di animali *morti in allevamento*, le cui numerosità sono stabilite annualmente dal Centro Nazionale per le Encefalopatie Animali (CEA) di Torino (IZS Piemonte e Valle d'Aosta).

Per quanto concerne la gestione dei greggi infetti, nel Regolamento sono previste una serie di misure volte al controllo e all'eradicazione del focolaio di malattia. All'accertamento del caso di EST fa seguito l'abbattimento di tutti i capi presenti nel gregge o l'abbattimento selettivo. Dove per abbattimento selettivo si intende l'abbattimento di tutti gli ovini esclusi quelli riconosciuti geneticamente resistenti. Sono perciò esclusi gli animali con genotipo ARR/ARR o che abbiano almeno un allele ARR e nel caso di pecore da riproduzione nessun VRQ. L'abbattimento selettivo viene indicato dal Ministero della Salute, con nota prot.

DGVA-VIII/43501/P-I.8.d/48 del 01/12/2006, quale scelta di preferenza ove applicabile. In entrambi i casi, abbattimento totale o selettivo, l'azienda viene sottoposta a restrizioni riguardanti sia lo spostamento che l'introduzione di animali, sempre sulla base del genotipo di appartenenza degli animali e per un periodo di tempo la cui lunghezza è definita sulla base del raggiungimento di un comprovato livello di resistenza alla scrapie.

Gli ovini in sorveglianza, sia attiva che passiva, sono sottoposti ad una prima diagnosi mediante test rapido eseguito dall'Istituto Zooprofilattico Regionale (IZS) su un omogenato di tessuto nervoso prelevato dal midollo allungato nella regione dell'obex. Qualora l'esito sia non negativo, il campione viene inviato al CEA per effettuare la conferma diagnostica con l'immunoistochimica (IHC) oppure immunoblot per SAF, microscopia elettronica o esame istopatologico. Nel caso di diagnosi confermata di EST, il CEA invia il campione all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), responsabile della tipizzazione molecolare del ceppo (azione che risponde alla necessità di individuare eventuali casi di BSE negli ovini) e delle analisi del genotipo PrP dell'ovino.

Nell'ambito delle attività di sorveglianza previste dal Regolamento 999/2001 viene introdotto nel 2007 l'obbligo di determinare ogni anno il genotipo della PrP per i codoni 136, 154, 171 di un campione minimo di individui rappresentativo dell'intera popolazione di ovini, la cui numerosità è stabilita sulla base della dimensione ovina nazionale. Nel caso dell'Italia esso deve comprendere almeno 600 ovini e sia la predisposizione del disegno del campione che le successive analisi di genotipizzazione sono di competenza dell'ISS. Le informazioni sui genotipi presenti negli Stati membri sono raccolte dal 2003 (Decisione 2002/1003/EC), anno in cui ogni Stato ha portato a termine per la prima volta uno studio sul genotipo della PrP per ciascuna delle sue razze ovine, autoctone o che costituissero una popolazione significativa del suo territorio. Sino al 2007 questo campione era rivolto su ovini di elevato merito genetico e quindi non rappresentativo della popolazione nazionale.

Complessivamente il sistema di sorveglianza attiva consente di valutare la tendenza della malattia nel tempo e ha buone capacità di identificare le variazioni geografiche e temporali. Fornisce inoltre indicazioni utili a livello locale per implementare la sorveglianza passiva ed è abbastanza flessibile per la definizione di popolazione sotto sorveglianza.

La sensibilità del sistema attivo risulta difficilmente calcolabile ma è evidente come questa sia ben lontana da alti livelli; ciò è dovuto non solo alle caratteristiche dei test utilizzati ma anche al disegno della sorveglianza stessa. Da un lato infatti la capacità del test di identificare gli animali infetti lontani dalla fase clinica è verosimilmente bassa nella categoria dei regolarmente macellati, dall'altro la probabilità di identificare un focolaio, ovvero un

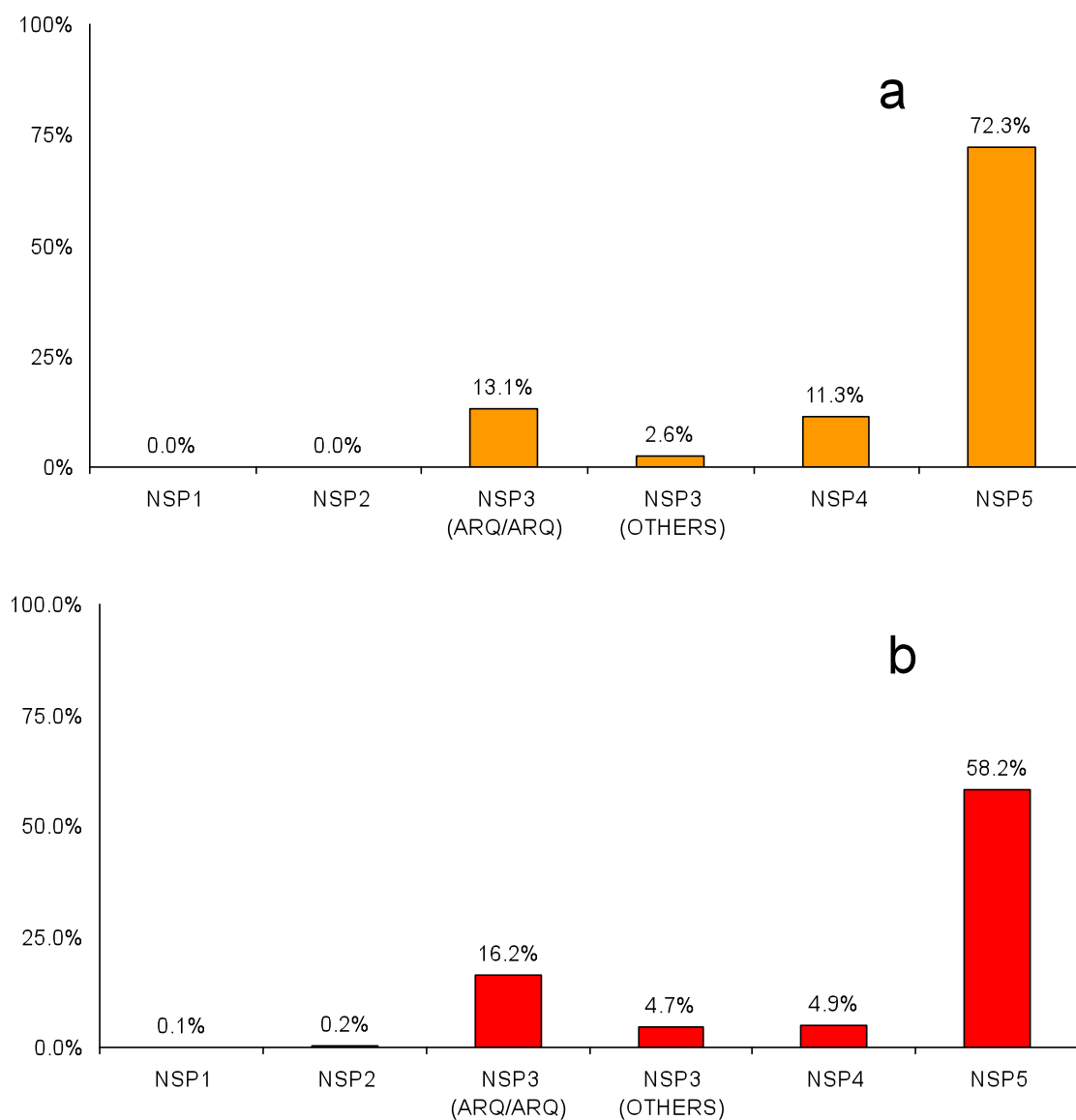
allevamento affetto da scrapie, dipende strettamente dal numero di animali testati provenienti dall'allevamento stesso. Se la scrapie fosse distribuita in maniera uniforme nella popolazione il sistema di sorveglianza attiva sarebbe più sensibile. Dai dati della sorveglianza attiva riportati nei *report* europei sul monitoraggio delle EST nei ruminanti per l'anno 2007 risulta infatti che la prevalenza della malattia all'interno di un allevamento sia circa 20 volte maggiore rispetto a quella nella popolazione generale. E' stato dimostrato come alcuni fattori, quali ad esempio la numerosità degli animali allevati nell'azienda, l'intensità degli scambi commerciali o la condivisione dei pascoli, influenzino la prevalenza della scrapie sia all'interno di un allevamenti che tra allevamenti, tale per cui alcune tipologie aziendali presentano una probabilità maggiore di essere affette da scrapie (Tongue *et al.*, 2009; Corbiere *et al.*, 2007). Dati gli elevati costi del sistema attivo non risulta possibile testare un numero di ovini superiore a quello assegnato al campione dalla normativa europea. Il sistema in questo senso risente maggiormente del mandato politico della tutela del consumatore, piuttosto che della sanità animale.

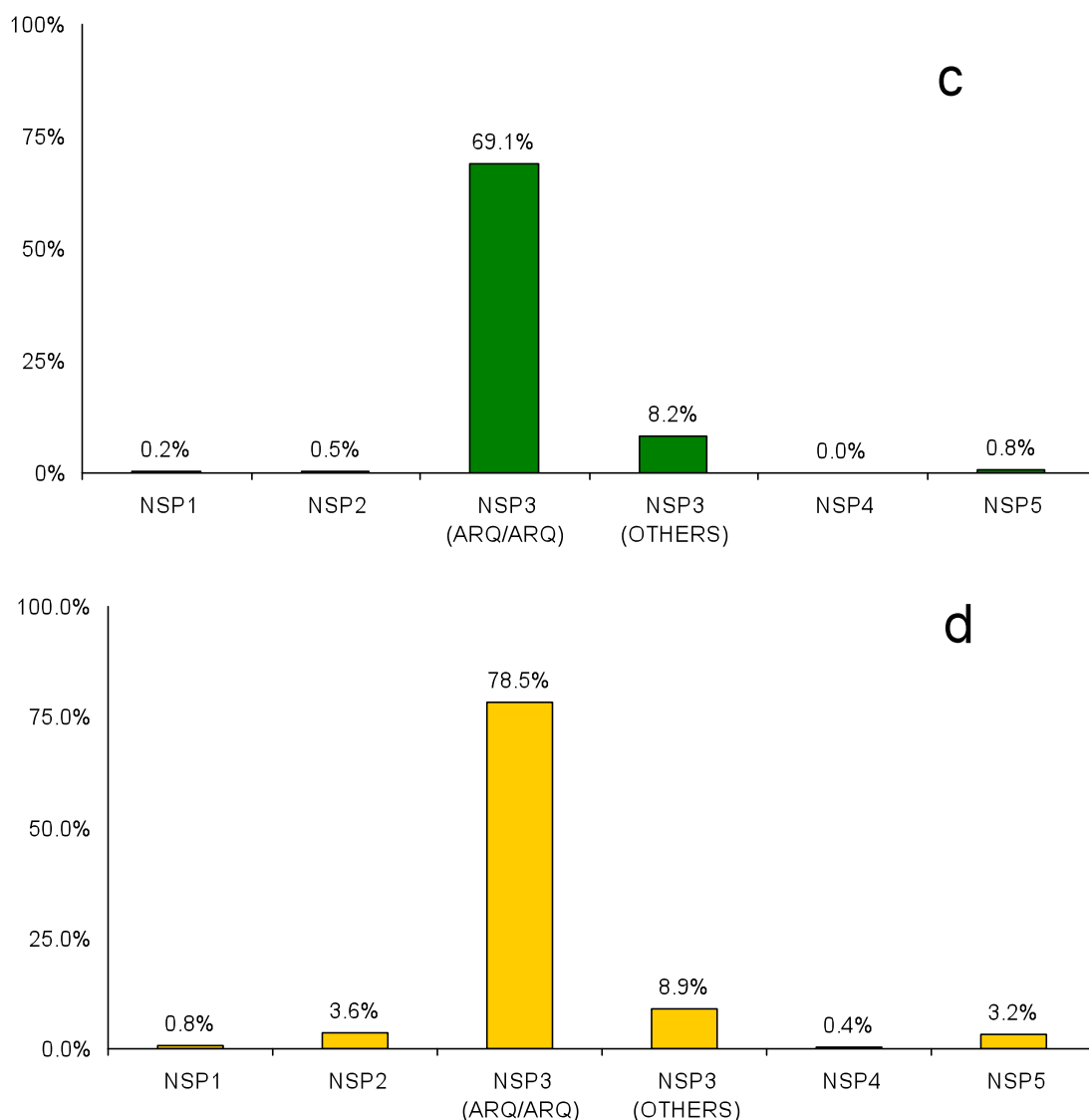
La sorveglianza passiva risulta meno penalizzata poiché si attua principalmente sulla categoria di animali morti in azienda, popolazione già di per sé a rischio di malattia. La sensibilità nel rilevare i casi di malattia è elevata rispetto all'attiva, se non fosse che, a dispetto dell'obbligatorietà del sistema, la segnalazione degli animali morti in azienda è soggetta a una forte sottonotifica.

Si tratta quindi di una malattia la cui diffusione è caratterizzata da prevalenze molto basse nella popolazione ovina, complessivamente in Europa si stimano circa 11 casi per 100.000 ovini testati, di cui 7 e 16 rispettivamente per le categorie dei regolarmente macellati e morti in allevamento (CE *report*). Appare evidente come questi casi siano in realtà una sottostima della reale frequenza della scrapie dovuta all'incapacità della sorveglianza di identificare tutti i focolai di malattia. Da ciò consegue l'impossibilità di controllare e eradicare la scrapie attuando misure di gestione dei focolai, parte dei quali sfugge al sistema di rilevazione, se non migliorando le attività del sistema di sorveglianza.

La Comunità Europea dissemina infatti le informazioni raccolte nella sorveglianza redigendo un *report* annuale con i risultati della sorveglianza stessa. Alcune tra le informazioni prodotte sono di seguito riportate in grafici che riassumono i risultati dell'attività di sorveglianza attiva e passiva per alcuni Paesi europei. Nello specifico si è scelto di riportare tali risultati per l'Olanda, la Gran Bretagna, la Spagna e l'Italia, con l'intento di raffigurare contesti molto diversi per quelle che sono le caratteristiche genotipiche dei casi di malattia.

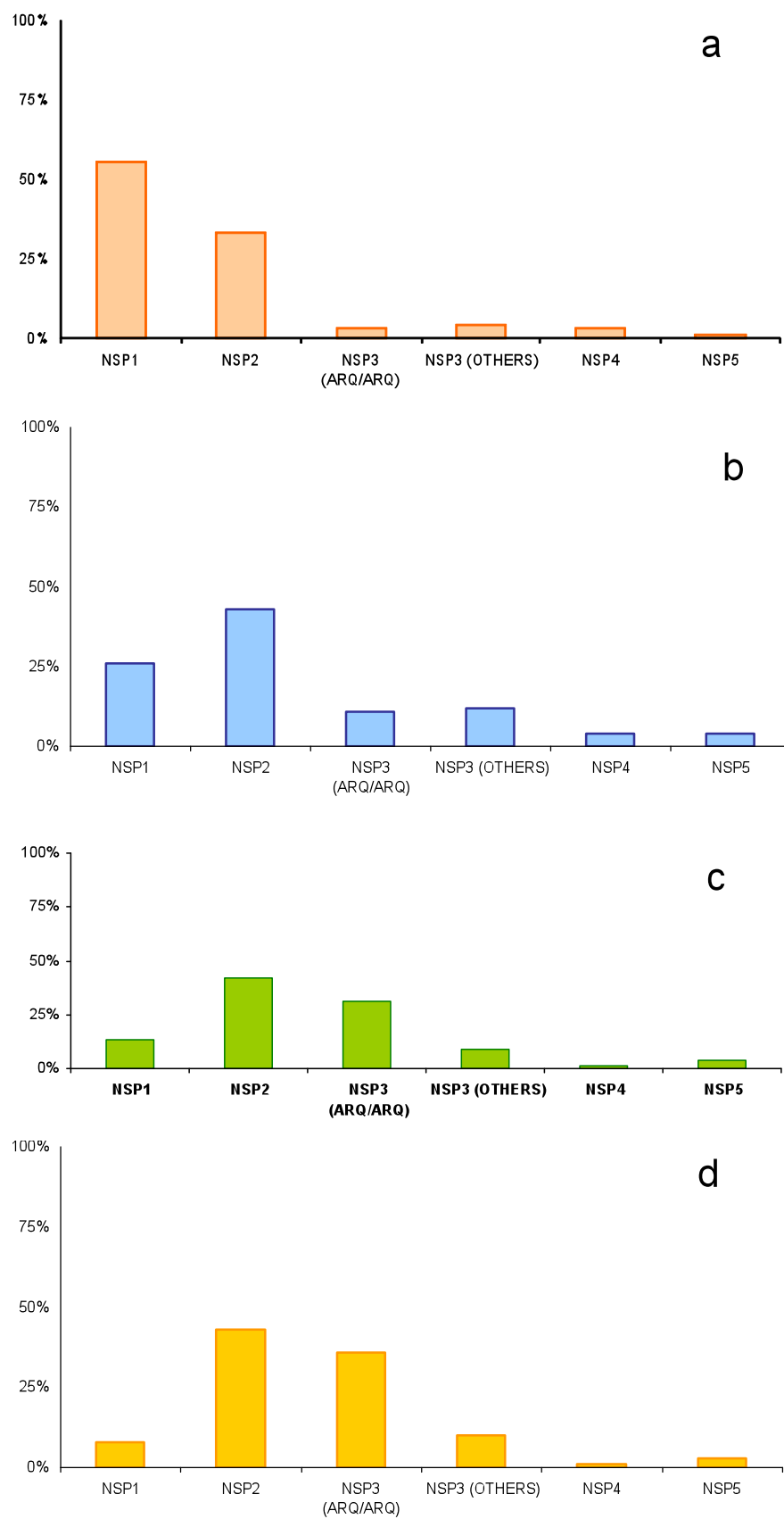
Nei *report* viene adottata la suddivisione dei genotipi (dei casi di malattia come degli animali sani) nelle classi di suscettibilità NSP. Pertanto è riportata in figura 1.3.1 la distribuzione genotipica dei casi confermati di EST per gli anni dal 2002 al 2007 per classe di suscettibilità NSP, in Olanda, Gran Bretagna, Italia e Spagna.





**Figura 1.3.1** - Distribuzione delle classi di rischio genotipico NSP nei casi confermati di scrapie dal 2002 al 2007 in Olanda (a), Regno Unito (b), Italia (c), Spagna (d). *Fonte - CE report*

Le frequenze genotipiche relative al campione ovino, rappresentativo della popolazione nazionale analizzato annualmente, sono riportate per l'anno 2007 in figura 1.3.2 per Olanda, Gran Bretagna, Spagna e Italia. Si è preferito riportare per l'Italia i dati relativi al 2008, poiché i dati 2007 essendo redatti dall'Associazione Nazionale Allevatori (ASSONAPA) hanno riguardato principalmente animali iscritti ai Libri Genealogici, le cui frequenze genotipiche sono sbilanciate a favore delle classi con minore suscettibilità.



**Figura 1.3.2** - Distribuzione delle classi di rischio genotipico NSP nella popolazione ovina nazionale nel 2007 in Olanda (a), Regno Unito (b) e Spagna (d). *Fonte* - CE report. Per l'Italia (c), l'anno di riferimento è il 2008; *fonte* – sorveglianza nazionale.

I dati di sorveglianza riportati evidenziano con chiarezza come differisca in differenti Paesi il genotipo degli ovini maggiormente colpiti dalla malattia. In contesti nazionali quali quello olandese o inglese i genotipi classificati come NSP5, ovvero contenenti almeno un allele VRQ, rappresentano più della metà dei casi nel periodo considerato. In Paesi quali Italia e Spagna, tali genotipi rappresentano solo una minima proporzione dei casi che ricorrono tra animali NSP3 ARQ/ARQ. Tale differenza, ad una prima analisi dei dati di sorveglianza, non sembra dovuta tanto ad una differente occorrenza dei genotipi nella popolazione generale, quanto a una maggiore suscettibilità evidenziata da animali ARQ/ARQ, tale per cui il calcolo della misura indiretta del rischio evidenzia come in Italia e Spagna nessun genotipo conferisca un rischio maggiore di acquisire la scrapie di ARQ/ARQ mentre in Olanda e Gran Bretagna nei genotipi NSP5 il rischio è rispettivamente 13 e 10 volte maggiore (tabella 1.3.1). Inoltre i dati della sorveglianza ufficiale in Italia mostrano che nel nostro paese circola un unico ceppo di scrapie classica (Di Bari *et al.*, 2008; Nonno *et al.*, 2003; Agrimi, dati non pubblicati).

<b>Odds Ratio</b>	<b>NSP1</b>	<b>NSP2</b>	<b>NSP3 (ARQ/ARQ)</b>	<b>NSP3 (OTHERS)</b>	<b>NSP4</b>	<b>NSP5</b>
Spagna	0,05	0,04	1	0,40	0,30	0,59
Francia	0,01	0,04	1	0,20	0,51	5,46
Irlanda	0,00	0,00	1	0,32	0,09	2,17
Italia	0,00	0,00	1	0,27	0,00	0,80
Olanda	0,00	0,00	1	0,16	1,14	12,96
Gran Bretagna	0,00	0,00	1	0,26	0,74	10,51

**Tabella 1.3.1** – Suscettibilità genotipica alla scrapie classica: calcolo degli odds ratio per alcuni Paesi membri. Fonte – Report europeo sul monitoraggio delle EST nei ruminanti, 2007.

## 1.4 Piani di selezione genetica per la resistenza alle EST negli ovini

La gestione della scrapie attraverso gli strumenti di lotta tradizionalmente impiegati in sanità per il controllo delle malattie infettive è resa particolarmente difficoltosa dal lungo periodo di incubazione, che spesso corrisponde o supera la vita commerciale degli ovini, dall'assenza di un test diagnostico *ante-mortem*, dall'abilità dell'agente patogeno di contaminare per lunghissimi periodi i pascoli e l'ambiente.

L'unica arma di prevenzione quale strumento fondamentale per arginare i seri problemi che crea al comparto zootecnico ovino, in termini economici e finanziari, sembra essere la selezione genetica. Ciò appare ancora più vero alla luce della attuale impossibilità della sorveglianza di individuare e eradicare tutti i focolai di infezione. L'attività di selezione



garantirebbe infatti la costituzione di una popolazione di animali genotipicamente resistenti tale da poter contenere la diffusione della malattia. Non essendo possibile individuare i soggetti infetti, se non al momento dell'insorgenza della sintomatologia quando l'eliminazione del patogeno nell'ambiente è già avvenuta, questa strategia, che non ha precedenti nell'ambito della lotta alle malattie infettive, sembra la strada più efficace nella gestione della scrapie ovina.

Per tale motivo l'Unione Europea ha adottato misure di controllo della scrapie negli ovini, basate su programmi volti a selezionare popolazioni geneticamente resistenti alle EST (Reg. 999/2001/CE). Queste misure assistono gli Stati membri nel controllo e nella riduzione dei problemi di salute animale riconducibili alle EST e contribuiscono a garantire la protezione dei consumatori riducendo il rischio di EST negli ovini, compresa la BSE qualora fosse presente nelle popolazioni di ovini.

L'introduzione di piani di selezione genetica per la resistenza alle EST nei confronti delle diverse razze ovine in ogni singolo Stato membro dell'Unione europea avviene con la Decisione 100/2003/CE, successivamente abrogata dal Regolamento 727/2007/CE e infine confluita nel testo consolidato al 2009 del Regolamento 999/2001/CE che reca disposizione per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune EST.

Le prescrizioni minime per la messa in opera del programma di allevamento vengono identificate in una serie di obblighi generali (parte 1) e di norme specifiche per i greggi partecipanti (parte 2). Nella prima parte rientrano l'istituzione di una banca dati che contenga le informazioni relative agli animali in selezione (razza, genotipo, gregge), un sistema per la gestione dei campioni e dei risultati di genotipizzazione e l'istituzione di programmi di allevamento che siano specifici per ciascuna razza, che tengano quindi conto della rarità della stessa, dell'eventuale deriva genetica a cui potrebbe essere esposta in condizione di riproduzione in consanguineità e della frequenza in essa dei diversi alleli. E' inoltre specificato come il programma debba concentrarsi su greggi di elevato valore genetico.

Nella seconda parte viene enunciato l'obiettivo del programma: aumentare la frequenza dell'allele ARR all'interno dei greggi, riducendo al contempo la prevalenza di quegli alleli che hanno dimostrato contribuire alla sensibilità alle EST. Risulta evidente come le azioni del piano facciano riferimento alla classificazione di suscettibilità dei genotipi PrP adottata nel NSP.

Le norme specifiche relative alla modalità di selezione degli animali riguardano infatti esclusivamente ovini con almeno un allele VRQ, presenti nelle classi NSP4 e NSP5 come altamente suscettibili. E' fatto divieto di riprodurre arieti portatori del VRQ, questi animali

possono lasciare l'azienda al solo scopo della macellazione e devono essere obbligatoriamente macellati o castrati entro sei mesi dalla determinazione del genotipo. Pur non essendo obbligatoria la determinazione dei genotipi nelle femmine, qualora esse fossero portatrici di un allele VRQ possono lasciare l'azienda solo per essere macellate. I greggi ovini che soddisfano i criteri prescritti dal programma vedranno riconosciuto lo status di resistente alle EST con due livelli minimi: greggi di livello I: composti esclusivamente da animali ARR/ARR; di livello II: greggi la cui progenie discende da montoni con genotipi ARR/ARR. A livello nazionale sono possibili ulteriori livelli.

La Decisione 100/2003/CE viene recepita dal D.M. 17 dicembre 2004 che introduce il Piano nazionale di selezione genetica per la resistenza alle EST negli ovini. L'adesione al piano è stata obbligatoria a partire dal 1° aprile 2005 per tutti i greggi ad elevato merito genetico ovvero i greggi iscritti ai libri genealogici (LG) o nei quali la percentuale di montoni in età riproduttiva iscritti ai libri sia uguale o superi il 50% dei montoni in età riproduttiva. Il piano si basa sui principi di selezione attraverso la linea maschile.

L'obiettivo è incrementare la frequenza dei caratteri di resistenza genetica alle EST nella popolazione ovina allo scopo di eradicarle dagli ovini, creare greggi a basso rischio di EST e contribuire alla tutela della salute umana e animale.

L'incremento dei caratteri di resistenza si realizza attraverso l'eliminazione dell'allele VRQ, con il divieto di utilizzo di riproduttori portatori di tale allele, l'incremento della frequenza dell'ARR negli allevamenti, la costituzione di serbatoi di arieti resistenti (con genotipi ARR/ARR) e la progressiva diminuzione della frequenza dell'allele ARQ. Allo scopo il piano prevede l'impiego a fini riproduttivi di montoni classificati in classi di preferenza a seconda del genotipo (tabella 1.4.1), classificazione che molto ha in comune con quella del NSP.

L'utilizzo ai fini riproduttivi dei montoni viene limitato nel tempo sulla base della classe di appartenenza con lievi differenze tra le razze in cui l'ARR è presente con una frequenza superiore al 40% e quelle in cui la frequenza è inferiore.

<b>Classe Riproduttori</b>	<b>Genotipi</b>	<b>Suscettibilità</b>	<b>Utilizzo montoni</b>	
			<i>razze con freq. ARR&gt;40%</i>	<i>razze con freq. ARR&lt;40%</i>
<b>1° Classe</b>	ARR/ARR	minima o nulla	illimitato	illimitato
<b>2° Classe</b>	ARR/ARH ARR/AHQ ARQ/ARR	scarsa	fino al 10° anno*	fino al 10° anno*
<b>3° Classe</b>	ARQ/ARQ ARQ/AHQ AHQ/AHQ ARQ/ARH ARH/ARH AHQ/ARH	elevata	fino al 5° anno*	fino al 7° anno*
<b>Divieto d'impiego</b>	VRQ/VRQ VRQ/ARQ VRQ/ARH VRQ/AHQ VRQ/ARR	elevata**	-	-

\* dall'inizio dell'attuazione del piano

\*\* ad eccezione di VRQ/ARR a suscettibilità scarsa ma portatore dell'allele maggiormente suscettibile

**Tabella 1.4.1** – Classificazione di suscettibilità dei genotipi PrP operata nel D.M. 17/12/2004.

La predisposizione di specifici piani di selezione viene demandata a livello regionale, in conformità allo schema di selezione nazionale del D.M. 17/12/2004. Le autorità regionali competenti devono quindi, nel redigere il piano, attenersi ai requisiti minimi previsti nello schema del piano nazionale.

Esistono pertanto lievi differenze di tempo tra regioni nell'inizio dell'attuazione dei programmi di selezione e conseguentemente nel limite di utilizzo dei montoni di classe 2° e 3°.

Fa eccezione la regione Sardegna che con il decreto N. 615/DecA/4 del 2009 predispone un piano alternativo, che prevede l'obbligatorietà per tutti gli allevamenti ad aderirvi e l'utilizzo illimitato nel tempo dei montoni di classe 2°.

L'autorizzazione a riprodurre montoni di genotipi suscettibile durante i primi anni dall'attuazione del piano è stata adottata per evitare da un lato che animali di elevato pregio genetico venissero persi e che si verificasse l'effetto collo di bottiglia nella creazione di serbatoi di arieti resistenti.

## II. Obiettivo

Obiettivo della presente tesi è stimare l'efficacia di diverse strategie di selezione genetica per incrementare la proporzione di capi portatori dei genotipi PrP associati a resistenza alla scrapie classica, nella popolazione ovina nazionale al fine di eradicare la scrapie classica in Italia.

Ciò verrà attuato attraverso lo sviluppo di un modello matematico che simuli la diffusione della scrapie nella popolazione ovina italiana e che rappresenta l'unico strumento capace di combinare insieme le numerosi variabili - relative all'agente e all'ospite - che permettono di riprodurre la dinamica di diffusione dell'infezione nella popolazione e di cogliere gli elementi indispensabili a descrivere l'andamento del piano di selezione genetica nella popolazione.

Saranno dunque fornite informazioni utili ad orientare le scelte di controllo della scrapie nel nostro Paese, basate sull'evidenza e che tengano conto delle specifiche caratteristiche del contesto in cui le strategie di controllo vengono applicate (caratteristiche demografiche e produttive della popolazione ovina, situazione epidemiologica della scrapie classica).

Nel nostro Paese è presente un unico ceppo di scrapie classica (Di Bari *et al.*, 2008; Nonno *et al.*, 2003; Agrimi, dati non pubblicati) che presenta un target genotipico specifico con una suscettibilità leggermente differente rispetto a quanto evidenziato negli studi svolti nell'Europa centro-settentrionale, su cui si basano i criteri selettivi adottati dal Regolamento 999/2001/CE.

Si intende pertanto valutare se siano efficaci nell'eradicare la scrapie le strategie derivanti dall'applicazione delle norme minime di selezione previste dall'Unione Europea, le strategie implementate sul territorio nazionale (D.M. 17/12/2004) e alcune strategie che utilizzano in selezione tutti i genotipi PrP che hanno dimostrato conferire resistenza alla scrapie negli ovini e presenti nella popolazione italiana con frequenze non trascurabili. In particolare sarà valutato se sotto diversi scenari di diffusione iniziale della malattia e sotto diverse ipotesi di adesione degli allevatori ai piani di selezione (compliance) sia vantaggioso privilegiare tipologie di selezione che favoriscano il mantenimento di un'ampia variabilità genotipica nella popolazione.

La condizione di eradicazione sarà verificata tramite il calcolo del numero riproduttivo di base ( $R_0$ ), parametro il cui valore quantifica la diffusione di una malattia nella popolazione ospite e gli sforzi necessari per interromperla. Si valuterà inoltre quale proporzione di

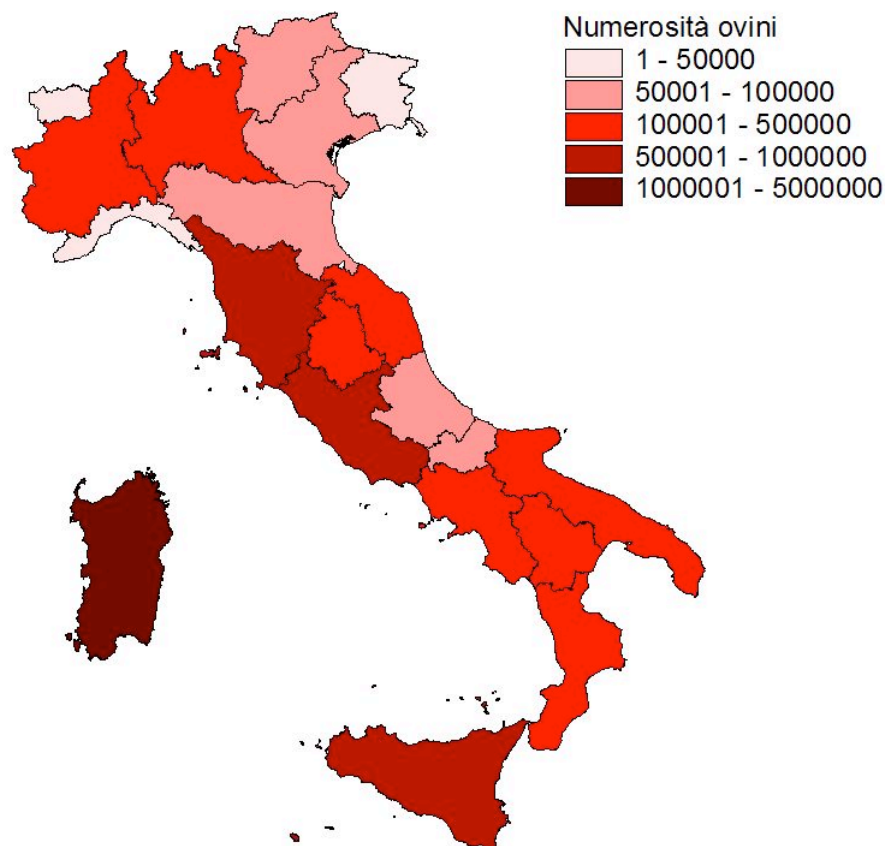
popolazione ovina debba essere interessata dal piano di selezione della PrP perché si interrompa la diffusione della malattia (ovvero si realizzi un effetto di popolazione).

A tal fine si è realizzato un modello matematico che simuli la diffusione della malattia negli ovini italiani in un periodo di tempo di 50 anni e che restituisca il valore che  $R_0$  assume all'inizio della selezione riproduttiva e durante la sua applicazione.

Con l'intento di considerare la popolazione italiana, il modello sarà applicato a tre distinte popolazioni ovine. La prima è costituita unicamente da animali di razza Sarda e rappresenta oltre la metà del patrimonio ovino nazionale, la seconda è costituita da individui di razza Sarda misti a meticcii e l'ultima dagli ovini italiani di razza Bergamasca.

## 2.1 Popolazione ovina italiana

L'allevamento ovino in Italia conta un patrimonio di oltre 7 milioni di capi allevati sull'intero territorio con diverse numerosità regionali (figura 2.1.1) e rappresenta una realtà importante nel panorama zootecnico nazionale.



**Figura 2.1.1** – Numerosità degli ovini allevati in Italia per regione. Fonte dati: Regioni e Banca Dati Nazionale (BDN)

Le regioni a più spiccata attività pastorizia ovina sono la Sardegna, 44% del patrimonio ovino nazionale, seguita da Sicilia (11%), Lazio (10%) e Toscana (7%).

La composizione della popolazione italiana per razza è riportata nella tabella 2.1.1, secondo quanto riportato dalle Regioni nell'ambito del programma di sorveglianza delle EST negli ovini (anni 2008-2009).

<b><i>Razza</i></b>	<b><i>Frequenza (%)</i></b>
Sarda	51,8
ovini meticci	17,6
Comisana	13,1
Bergamasca	2,8
Merinizzata	2,2
Bagnolese	2,0
Massese	1,5
Biellese	1,4
Appenninica	1,2
Laticauda	1,0
Valle del Belice	1,0
Gentile di Puglia	0,9
Leccese	0,8
Pinzirità	0,6
Bergschaf	0,4
Altamurana	0,2
Alpina tirolese	0,2
Barbaresca	0,2
delle Langhe	0,2
Fabrianese	0,2
Garfagnina	0,2
Jura	0,2
Sambucana	0,2
Carsolina	0,1
nero-bruna	0,1
Sopravvissana	0,1
Totale	100

**Tabella 2.1.1** – Frequenza delle razze ovine in Italia

La razza ovina principalmente allevata è la Sarda, a prevalente attitudine alla produzione di latte. Autoctona della Sardegna, dove rappresenta la totalità degli ovini presenti, si è diffusa in tutta l'Italia centrale, in particolare nella Maremma toscana e laziale, è presente a bassa numerosità anche in Romagna, Calabria, Basilicata, in virtù della sue caratteristiche di rusticità e produttività. Viene generalmente allevata in allevamenti di grandi dimensioni, che risultano quindi numericamente esigui ma che contengono gran parte della popolazione ovina.

La razza da carne a maggiore diffusione e importanza è sicuramente la Bergamasca, presente principalmente in Lombardia, Piemonte ed Emilia. E' evidente come pur essendo la prima

per numerosità tra le razze da carne allevate, in realtà la sua numerosità è alquanto esigua se confrontata con la dimensione della Sarda o complessivamente delle razze da latte.

In ordine di consistenza alla Sarda fa seguito la popolazione ovina di meticci, che deriva nella maggior parte dei casi da incroci tra razze da latte, solitamente la Sarda stessa, e da carne.

Le caratteristiche genetiche espresse in frequenze alleliche, con sequenziamento completo del gene *Prnp*, delle razze che rivestono maggior importanza per la produzione del latte (Sarda), della carne (Bergamasca) e per numerosità (meticci) sono riportate in tabella 2.1.2, unitamente alle frequenze alleliche della popolazione nazionale non divisa in razze.

<b>Allele</b>	<b>Sarda</b>		<b>Ovini meticci</b>		<b>Bergamasca</b>		<b>Popolazione italiana</b>	
	<i>N</i>	<i>f (%)</i>	<i>N</i>	<i>f (%)</i>	<i>N</i>	<i>f (%)</i>	<i>N</i>	<i>f (%)</i>
ARQ	559	44,6	171	41,7	53	54,1	1066	44,3
ARR	479	38,2	151	36,8	12	12,2	886	36,8
AF141RQ	62	4,9	12	2,9	8	8,2	98	4,1
AHQ	57	4,5	18	4,4	3	3,1	104	4,3
ARQK176	51	4,1	5	1,2			60	2,5
AT137RQ	32	2,6					34	1,4
T112ARQ	6	0,5	9	2,2	3	3,1	37	1,5
VRQ	2	0,2	13	3,2	6	6,1	41	1,7
ARH	2	0,2	16	3,9	2	2	32	1,3
G127ARQ	2	0,2					2	0,1
AR143RQ	1	0,1	5	1,2	2	2	14	0,6
P23ARQ	1	0,1					1	0,0
S127ARQ			1	0,2			3	0,1
ARK			1	0,2	7	7,1	9	0,4
ARD127Q							2	0,1
R101ARQ			3	0,7	1	1	7	0,3
AF141RQP237			2	0,5			2	0,1
ARQQ211			1	0,2			1	0,0
R114ARQ			1	0,2			1	0,0
T112ARQP237			1	0,2			1	0,0
ARQL189							1	0,0
ARQY180							3	0,1
V127ARQ							2	0,1
AC151RQ					1	1	1	0,0
<b>Totale</b>	1254	100	410		98	100	2408	100
<b>N animali</b>	627		205		49		1204	

**Tabella 2.1.2** – Frequenze alleliche nelle razze Sarda e Bergamasca, nella popolazione di ovini meticci e nella popolazione generale non divisa in razze. *Fonte* – sorveglianza italiana per gli anni 2008 e 2009, per la Bergamasca 2008, 2009, 2010.

Il modello è stato applicato a tre distinte popolazioni ovine. La prima è costituita unicamente da animali di razza Sarda e rappresenta poco più della metà del patrimonio ovino nazionale.

Con l'intento di rappresentare una proporzione più ampia degli ovini italiani, la seconda popolazione è stata costruita unendo la popolazione di razza Sarda con quella di ovini meticci. Tale scelta è in linea con il principio per cui gli ovini meticci derivino per la maggior

parte dalla razza maggiormente presente sul territorio, appunto la Sarda. Infatti i genotipi che caratterizzano gli incroci non si discostano molto dai genotipi presenti nella Sarda nonostante presentino frequenze caratteristiche della PrP leggermente diverse e una maggiore varietà di mutazioni dell'allele ARQ. Pur non essendo concettualmente corretto considerare Sarda e Meticcias come un'unica popolazione è questa una semplificazione che oltre a permettere di estendere i risultati al 70% degli ovini presenti in Italia, presenta l'ulteriore vantaggio di implementare il modello con dati più robusti.

La terza popolazione è costituita unicamente da ovini di razza Bergamasca. Con la scelta di questa popolazione, che rappresenta meno del 3% di quella nazionale, si è voluto esplorare una condizione, comune a numerose razze caratterizzate da ridotta numerosità, in cui i genotipi caratteristici (qualità e quantità) siano diversi da quelli delle razze maggiormente allevate e al tempo stesso più simili a quelli presenti nelle razze nord-europee. La Bergamasca è infatti caratterizzata da una forte presenza degli alleli VRQ e ARK (tabella 2.1.2).

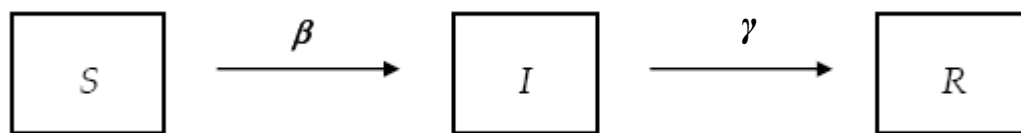
## **2.2 Cenni di modelli di dinamica di diffusione SIR**

Negli ultimi decenni, la sanità pubblica veterinaria è ricorsa in maniera crescente all'elaborazione di modelli matematici, quali strumenti di analisi propri dell'epidemiologia quantitativa, finalizzati allo studio della diffusione delle malattie infettive, come dimostrato dal recente e notevole incremento delle pubblicazioni sull'argomento nella letteratura scientifica (Keeling e Rohani, 2008). Descrivere con un approccio matematico la diffusione di un patogeno in una popolazione facilita sia la comprensione dei meccanismi che ne regolano la diffusione sia la pianificazione di mirate misure di intervento/controllo (Hethcote e Van Den, 1995, Anderson e May, 1992). I modelli consentono infatti di predire matematicamente l'evoluzione delle variabili di interesse, sotto determinate ipotesi ambientali e di intervento. In tal modo è possibile valutare a priori e confrontare l'efficacia di diverse strategie di controllo, a seconda del contesto di intervento ipotizzato. L'uso dei modelli come strumento di supporto informativo alle strategie di controllo delle malattie infettive in sanità pubblica è l'applicazione di gran lunga più comune dei modelli matematici in ambito epidemiologico.

Larghissima parte della modellistica applicata alle malattie infettive e/o diffusive, il cui agente causale sia un microparassita (Anderson e May, 1992), si basa sull'applicazione di



modelli compartimentali di tipo Suscettibile-Infetto-Immune (SIR) utili nel tracciare lo stato di infezione degli individui che costituiscono la popolazione ospite in cui diffonde il patogeno, che possono essere fatti risalire ai lavori di Kermack e McKendrick all'inizio degli anni '30 (1927; 1932; 1933). Questi modelli propongono la ripartizione della popolazione in classi o compartimenti, sulla base dello stato di infezione o clinico dell'individuo: i suscettibili (S), che possono contrarre l'infezione; gli infetti (I), che hanno contratto l'infezione e possono trasmetterla ad altri; gli immuni o rimossi (R), che hanno contratto l'infezione ma non sono in grado di trasmetterla, né possono infettarsi nuovamente. Il diagramma di flusso di un modello compartimentale SIR può essere così rappresentato:



dove  $\beta$  è il tasso di trasmissione e definisce la frazione istantanea di suscettibili che, in seguito al contatto con un infetto, acquisiscono l'infezione nell'unità di tempo. E' quindi un tasso caratteristico per ciascun agente patogeno all'interno di una popolazione;  $\gamma$  è tasso di guarigione ovvero il tasso istantaneo pro-capite di passaggio dallo stato infetto allo stato rimosso; definisce la frazione di infetti che guariscono o acquisiscono immunità nell'unità di tempo. Il suo reciproco corrisponde alla durata della malattia o tempo di guarigione.

Nel diagramma è implicitamente assunto che non vi sia un tempo di incubazione, ossia che ogni infetto sia immediatamente infettivo, che il contagio avvenga per contatto diretto, che la probabilità di incontro tra due qualsiasi individui della popolazione sia uguale e che ogni individuo malato abbia una probabilità di guarigione per unità di tempo costante. Il numero di nuovi infetti per unità di tempo sarà quindi proporzionale al numero di contatti tra individui nella classe S e individui nella classe I, ossia proporzionale al prodotto SI. Nella stessa unità di tempo ci sarà una proporzione di individui malati che guarisce. E' possibile conoscere il numero di individui presenti all'interno di ciascun compartimento al tempo  $t$  impostando e risolvendo analiticamente le seguenti equazioni differenziali:

$$dS/dt = -\beta SI \quad (1)$$

$$dI/dt = \beta SI \quad (2)$$

$$dR/dt = \gamma I \quad (3)$$

Il numero complessivo di individui che al tempo  $t$  compongono la popolazione è dato dalla somma delle tre classi:

$$N(t) = S(t) + I(t) + R(t) \quad (4)$$

Il parametro chiave di modelli di questo tipo è il numero riproduttivo di base ( $R_0$ ) che rappresenta il numero medio di infezioni secondarie che un individuo infetto produce in una popolazione totalmente suscettibile, nel corso della sua malattia (5) (Keeling e Rohani, 2008; Dieckman e Heesterbeek, 2000).

$$R_0 = \frac{\beta}{\gamma} \quad (5)$$

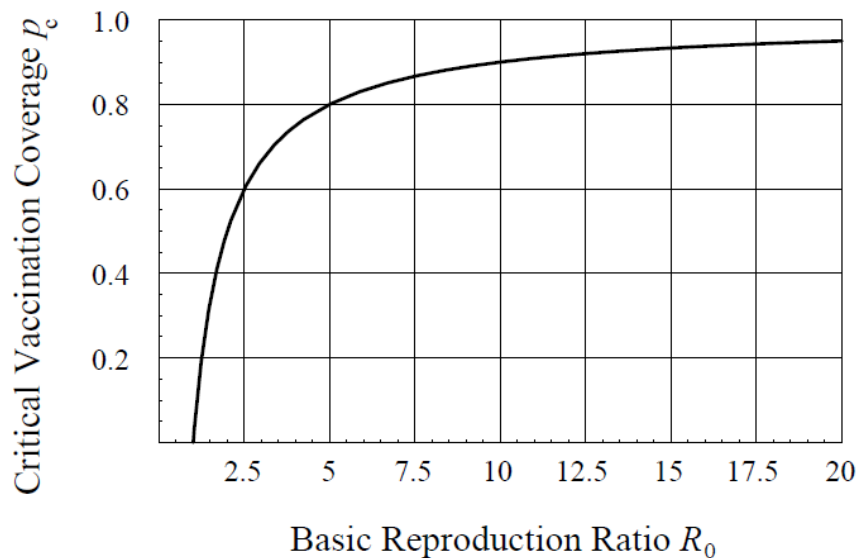
$R_0$  quantifica la capacità diffusiva di un patogeno in una popolazione, permettendo di prevederne l'andamento. Quando l'introduzione di un individuo infetto in una popolazione suscettibile genera in media 1 caso secondario ( $R_0 = 1$ ) vuol dire che l'infezione ha un andamento endemico; valori di  $R_0$  superiori ( $R_0 > 1$ ) o inferiori ( $R_0 < 1$ ) indicano, rispettivamente, il mantenimento o l'estinzione della stessa. Pertanto la riduzione del valore di  $R_0$  al di sotto di un limite soglia ( $R_0 < 1$ ) per il quale una malattia non può persistere all'interno di una popolazione, è l'obiettivo delle campagne di intervento per la lotta alle malattie infettive (2, 4).

La condizione di estinzione di un'infezione ( $R_0 < 1$ ) si verifica solo quando la numerosità della popolazione suscettibile scende al di sotto di un valore limite di individui ( $S < 1/R_0$ ), tale per cui un individuo  $I$ , nel tempo in cui decorre la sua malattia, non è in grado di infettare un individuo  $S$ , a causa della scarsità di  $S$  disponibili. Il raggiungimento di questa soglia critica di suscettibili in una popolazione è legato alla rimozione dello stato di suscettibilità, tramite una campagna vaccinale o depopolamento in contesti di popolazioni a vita libera, di una quota critica di individui suscettibili ( $p_c$ ) data da (6).

$$p_c = 1 - 1/R_0 \quad (6)$$

Esiste pertanto una stretta relazione tra il valore di  $R_0$ , specifico per la diffusione di un patogeno in una determinata popolazione, e la quota di popolazione che deve essere resa non

più suscettibile all'infezione  $p_c$  (*critical vaccination coverage*) tale per cui la malattia sia eradicata dalla popolazione stessa (figura 2.2.1).



**Figura 2.2.1** – Relazione esistente tra il valore iniziale di  $R_0$  per una determinata malattia in una popolazione e la proporzione di popolazione che deve essere resa non più suscettibile ( $p_c$ ) affinché si realizzi la condizione  $R_0 < 1$ .

Rimosso lo stato di suscettibilità nella porzione  $p_c$  di popolazione, gli individui ancora suscettibili risultano indirettamente protetti dall'infezione per una ridotta circolazione dell'agente patogeno che di conseguenza riduce la probabilità che un individuo sia esposto alla malattia; questa condizione è nota come “effetto di popolazione”.

Il mancato raggiungimento, durante un programma di intervento, del limite soglia esiterà semplicemente in un rallentamento della trasmissione dell'infezione, con diminuzione di prevalenza e incidenza senza mai condurre alla sua estinzione.

Data la complessità che caratterizza la trasmissione della scrapie tra animali e la sua diffusione tra allevamenti e l'incompletezza e l'incertezza delle informazioni disponibili per descriverle, negli ultimi dieci anni si è ricorso all'uso della modellistica matematica applicata alla dinamica di diffusione della scrapie negli ovini.

Le tipologie di modelli utilizzate, le assunzioni che li determinano e i dati che li hanno alimentati sono decisamente vari. Al contrario gli obiettivi che si sono posti sono spesso condivisi e riguardano l'indagine epidemiologica della scrapie ovina in un gruppo di animali e la valutazione dell'efficacia di differenti strategie di controllo, in particolare della selezione genetica della PrP.

L'intento dei primi lavori di modellistica sulla scrapie è stato infatti stimare i parametri chiave (tasso di trasmissione orizzontale e verticale, periodo di incubazione, rischio genotipico) coinvolti nella trasmissione all'interno di un gregge per poterne riprodurre la diffusione (Woolhouse *et al.*, 1999; Matthews *et al.*, 2001), valutare la sensibilità del modello ai parametri stessi e definire quali siano le misure di intervento che maggiormente influenzano il corso dell'epidemia del gregge.

E' stato dimostrato come la riduzione della frequenza degli alleli suscettibili nel gregge (Matthews *et al.*, 1999) e la riduzione della trasmissione orizzontale, piuttosto che quella verticale, (Woolhouse *et al.*, 1999) abbiano un effetto consistente nel ridurre il valore di  $R_0$ , seppur alla luce delle difficoltà di identificazione precoce degli animali infetti. Sempre Woolhouse (1999) ha evidenziato come durante un focolaio vi sia una forte selezione contro i genotipi suscettibili, la cui speranza di vita non arriva alla manifestazione clinica della malattia. Hagenaars (2001), per spiegare la persistenza della malattia in un gregge, ha posto l'attenzione sulla possibile fonte d'infezione ambientale e su come la probabilità di estinzione di un focolaio sia enormemente ridotta dalla persistenza ambientale del prione. Inoltre ha sottolineato la difficoltà di stimare il valore reale dei parametri di trasmissione e di  $R_0$ , essendo i dati di campo consistenti con diversi valori dei parametri in esame (Hagenaars *et al.*, 2003).

La presenza della scrapie in UK è stata ricondotta all'occorrenza di una epidemia, iniziata nel 1700 e di durata nell'ordine di centinaia di anni, che si estinguerà per la selezione naturale dei genotipi resistenti alla malattia, il cui processo/decorso può essere accelerato aiutando la selezione naturale con una programmata (Woolhouse *et al.*, 2001). Anche secondo Truscot e Ferguson (2008 a,b), senza alcun intervento volto a controllarne la diffusione, la scrapie sarebbe soggetta ad estinzione naturale in 300/400 anni.

Si è inoltre cercato di valutare a priori l'efficacia di diverse misure di intervento per controllare la diffusione della scrapie non tanto all'interno di un gregge infetto quanto a livello di popolazione. Per far ciò è indispensabile la stima della diffusione della malattia in termini di incidenza o di  $R_0$  per valutarne la modificazione a seguito dell'intervento. Gravenor *et al.*, (2004) stimano a Cipro un  $R_0$  pari 1,4-1,8 e considerano come l'identificazione precoce di un focolaio e le misure di isolamento dei greggi infetti risultino efficienti nell'arrestare la diffusione. Kao *et al.*, (2001) stima nella popolazione un  $R_0 = 1,1-1,2$  e dimostra come programmi di selezione genetica indirizzati ai greggi maggiormente a rischio (con  $R_0$  intra-gregge  $> 1$ ) permettano di eradicare la malattia più velocemente rispetto all'implementazione di misure indirizzate a tutta la popolazione. In particolare valuta come

l'introduzione della scrapie in un allevamento "sano" da un allevamento in cui è presente la malattia si verifichi con lo scambio commerciale degli animali e la condivisione di pascoli. Anche la dimensione del gregge, avendo un effetto diretto sulla durata del focolaio, dovrebbe essere un criterio per pianificare gli interventi di controllo (Gubbins 2005a). L'abbattimento di tutti i capi all'interno di un focolaio è risultata essere la misura più efficace nell'eradicare la malattia (Gubbins e Webb 2005; Truscot e Ferguson, 2008b). Per cui investire nel migliorare la notifica dei casi risulta essere una componente essenziale nel piano di controllo (Gubbins e Webb 2005), soprattutto alla luce della notevole sottotifica a cui è soggetta la scrapie. E' stato infatti stimato che l'80% dei casi di malattia sfuggono alla rilevazione del sistema e quindi all'applicazione di misure restrittive (Hagenaars *et al.*, 2006).

Negli ultimi anni la ricerca si è indirizzata soprattutto allo studio della diffusione della malattia tra allevamenti su intere popolazioni nazionali e sulle possibili strategie di controllo. L'orientamento dei lavori in letteratura in questo senso è stato verso l'implementazione di schemi d'intervento che utilizzano metodologie di selezione genetica della PrP, abbattimento e restrizione di movimento degli ovini variamente combinate tra loro.

Nel Regno Unito, dove si è sviluppata una corposa letteratura sulla modellistica di dinamica di diffusione della scrapie, si ritiene comunque che la selezione genetica possa costituire di per sé un'efficace misura di prevenzione della malattia. Vari autori ritengono infatti che operare una selezione unicamente a sfavore dell'allele VRQ sia sufficiente per l'eliminazione della scrapie dal territorio nazionale (Gubbins e Webb 2005; Truscot e Ferguson, 2008b).

### III. Materiali e metodi

#### 3.1 Introduzione al modello

Il modello si propone di valutare e confrontare l'efficacia nel tempo di diverse strategie di selezione della popolazione ovina italiana, finalizzate a incrementare la quota di capi con genotipi PrP resistenti alla scrapie classica al fine di ridurre progressivamente l'incidenza della malattia e permetterne l'eradicazione.

A partire dai dati a nostra disposizione circa la prevalenza della scrapie in Italia nella popolazione ovina, il modello riproduce la diffusione della malattia negli ovini lungo un arco di tempo di 50 anni, tenendo in considerazione le caratteristiche proprie della popolazione ospite e dell'agente infettante che risultano determinanti nell'epidemiologia della scrapie.

L'aspetto essenziale considerato nel modello relativo all'ospite è la distribuzione dei genotipi PrP nella popolazione ovina e come questa vari in relazione alla dinamica demografica. La dinamica demografica deve infatti tenere conto della particolare struttura di una popolazione zootecnica, stratificata in unità di allevamento che comprendono i singoli capi (unità animali) e considerare le variazioni agenti su ciascuno di tali elementi. Tra queste, la scelta dei riproduttori ovvero la selezione genetica. Tra gli aspetti essenziali catturati dal modello rispetto l'agente di malattia vi è lo specifico target d'ospite e il periodo di incubazione prodotti dal ceppo di scrapie circolante in Italia.

Il modello si compone complessivamente di tre parti strutturalmente indipendenti ma intimamente connesse; il risultato di ciascuna di esse alimenta la parte successiva. Queste sono costituite da:

- un modello *genotipico di popolazione*, deterministico e discreto che consente di stimare la distribuzione nel tempo dei genotipi della PrP in ciascuna unità d'allevamento, in funzione della strategia selettiva adottata e delle caratteristiche demografiche e riproduttive.

- un modello compartimentale di *diffusione della scrapie tra animali*, deterministico ed eterogeneo per classi di rischio genotipico, che consente di stimare la diffusione della malattia tra gli animali di uno stesso allevamento in funzione della prevalenza iniziale della scrapie e della distribuzione nel tempo delle frequenze genotipiche della PrP. Il risultato parziale è il numero riproduttivo di base tra animali  $R_0$  ( $R_0^{ba}$ ) ovvero il numero medio di

infezioni secondarie che un individuo infetto genera in una popolazione totalmente suscettibile durante la durata della sua malattia (Anderson May, 1992; Diekmann and Heesterbeek, 2000);

- un modello di *diffusione della scrapie tra allevamenti*, che permette di valutare la diffusione della malattia nella popolazione ovina complessiva, in funzione della diffusione della malattia tra animali ( $R_0^{ba}$ ), del grado di adesione (*compliance*) delle unità d'allevamento alla selezione genetica e della prevalenza iniziale della scrapie tra unità di allevamento. Il risultato è il numero riproduttivo di base tra allevamenti ( $R_0^{bf}$ ) ovvero il numero di focolai secondari generati da un allevamento infetto durante la durata del focolaio stesso.

In tabella 3.1.1 è descritto schematicamente il modello e le sue componenti.

<b>Parte del modello</b>	<b>Risultato</b>
1. Modello genotipico di popolazione	Composizione genotipica della popolazione di anno in anno <b><math>R_0</math> tra animali (<math>R_0^{ba}</math>)</b>
2. Modello di trasmissione tra animali	casi secondari generati da un individuo infetto durante il periodo infettante <b><math>R_0</math> tra allevamenti (<math>R_0^{bf}</math>)</b>
3. Modello di trasmissione tra allevamenti	focolai secondari generati da un allevamento infetto durante la durata del focolaio

**Tabella 3.1.1** – Struttura complessiva del modello e risultato parziale di ciascuna componente del modello.

Il risultato del modello, definito *output* del modello, sarà quindi, per ogni strategia selettiva, il tempo  $t$  al quale si realizza la condizione indispensabile all'eradicazione della scrapie cioè  $R_0^{bf} < 1$ , dove il tempo è l'indicatore di efficacia della strategia selettiva.

Il rapporto tra l'*output* di ciascuna strategia selettiva e l'*output* della strategia di selezione di riferimento sarà un ulteriore risultato del modello, definito come *outcome*, che permette di confrontare tra loro l'efficacia delle diverse strategie.

I modelli genotipico di popolazione e di trasmissione tra animali sono stati realizzati mediante l'utilizzo del software Matematica 8® (Wolfram Research, Champaign, IL), mentre per il modello di trasmissione tra allevamenti è stato utilizzato il software Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

## 3.2 Modello genotipico di popolazione

### 3.2.1 Razionale

Con il fine di descrivere la diffusione della scrapie in una popolazione ovina è stato sviluppato un modello genotipico di popolazione che include le caratteristiche salienti delle unità di allevamento.

Il modello permette di stimare l'andamento nel tempo delle frequenze dei genotipi PrP degli ovini allevati in unità di allevamento, a partire dalle frequenze genotipiche note. La trasmissione del gene che codifica per la PrP segue il principio mendeliano della segregazione e dell'assortimento indipendente dei caratteri autosomici, per cui conoscendo le frequenze genotipiche della PrP negli ovini è possibile stimare quale sarà la frequenza dei genotipi nelle generazioni successive utilizzando la legge di Hardy-Weinberg.

Dati i genotipi  $kk$ ,  $kq$  e  $qq$ , che derivano dalla combinazione degli alleli  $k$  e  $q$  la cui frequenza allelica nella popolazione sia  $f_k$  e  $f_q$ , la frequenza dei genotipi nella generazione successiva sarà data da  $f_k^2 + 2f_kf_q + f_q^2 = 1$ , rispettivamente per il genotipo  $kk$ ,  $kq$  e  $qq$ .

Le frequenze genotipiche attese nei nuovi nati, così ottenute, saranno calcolate sia in condizioni naturali ovvero di assenza di selezione genetica specifica per la PrP, che sotto diversi scenari di selezione genetica per specifici alleli PrP. La selezione genetica sarà attuata esclusivamente su linea maschile per cui in condizioni naturali le frequenze genotipiche degli arieti saranno uguali alle frequenze della popolazione, mentre nei diversi scenari di selezione gli arieti saranno selezionati in base al genotipo PrP ovvero le frequenze genotipiche dei riproduttori sono diverse dalle frequenze della popolazione generale.

La popolazione inclusa nel modello è una popolazione zootecnica con caratteristiche note, rispetto alle quali, nello sviluppo del modello, sono stati adottati alcuni assunti. La popolazione adulta, che è definita come ovini di genere femminile nati almeno l'anno precedente, si riproduce una sola volta l'anno, in un unico momento e gli accoppiamenti sono casuali. I nuovi nati sono invece gli agnelli nati nell'anno. Si tratta di una popolazione chiusa, ovvero non interessata da movimenti migratori (la rimonta è interna) nell'unità allevamento; demograficamente stabile, che mantiene quindi la stessa composizione per età; stazionaria, per cui il numero di nati nell'anno precedente, che entrano a far parte della popolazione adulta, eguaglia quello degli animali rimossi dalla popolazione adulta, secondo il tasso di rimonta\*, mantenendo così costante la numerosità. Infatti solo una parte dei nuovi nati rimarrà all'interno della popolazione e contribuirà a caratterizzare la popolazione adulta



dell'anno successivo, sostituendo quegli animali che vengono rimossi, secondo il tasso di rimonta annuale, perché morti, macellati o altro.

### 3.2.2 Struttura

E' possibile calcolare nell'anno  $t$  la frequenza del genotipo  $i$  nei nuovi nati ( $f_{i,t}^l$ ) conoscendo la distribuzione genotipica nei riproduttori nello stesso anno  $t$ . Nello specifico  $f_{i,t}^l$  è il prodotto tra una matrice, i cui componenti rappresentano le frequenze alleliche negli arieti (impostate all'inizio della selezione), e un vettore i cui elementi sono le frequenze genotipiche delle femmine adulte dell'anno precedente  $f_{i,t-1}^{sb}$ . Considerando ad esempio una popolazione in cui siano presenti tre genotipi dati da due alleli  $k$  e  $q$  e indicando la frequenza di tali alleli negli arieti con  $f_k$  e  $f_q$ , e le frequenze genotipiche rispettivamente con  $f_{kk}$ ,  $f_{kq}$  e  $f_{qq}$ , nei nuovi nati la proporzione di ciascuno di essi è così calcolata (Hagenaars *et al.*, 2000):

$$\begin{pmatrix} f_{kk,t}^l \\ f_{kq,t}^l \\ f_{qq,t}^l \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} f_k & f_{k/2} & 0 \\ f_q & 1/2 & f_k \\ 0 & f_{q/2} & f_q \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f_{kk,t-1}^{sb} \\ f_{kq,t-1}^{sb} \\ f_{qq,t-1}^{sb} \end{pmatrix}$$

La matrice e il vettore che nel modello hanno permesso di calcolare la distribuzione dei genotipi PrP nei nuovi nati sono riportati in appendice (tabella 3.2.1).

La frequenza complessiva di un genotipo nella popolazione adulta  $f_{i,t}^{sb}$  sarà determinata dal tasso di rimonta  $\mu$  (proporzione di nuovi nati che sostituisce gli animali uscenti dalla popolazione adulta) e dalla frequenza che quel genotipo ha nelle pecore adulte dell'anno precedente  $f_{i,t-1}^{sb}$  e di quella porzione degli agnelli nati nell'anno precedente che vanno a compensare la rimonta, come segue:

$$f_{i,t}^{sb} = \mu f_{i,t-1}^l + (1 - \mu) f_{i,t-1}^{sb}$$

### 3.2.3 Dati e fonti dati

#### 3.2.3.1 Informazioni demografiche

La fonte informativa riguardo la demografia della popolazione ovina è il “Bollettino dei controlli della produttività del latte negli ovini” redatto dall'Associazione Italiana Allevatori

(AIA) per gli anni 2004-2009. Le informazioni utilizzate riguardano l'età degli animali al primo parto (media: 17 mesi), il numero di parti l'anno (1 parto) e il tasso annuale di rimonta (*range*: 21-30%).

### 3.2.3.2 Frequenze genotipiche di popolazione

La fonte informativa sulle frequenze genotipiche delle popolazioni ovine è il campione ovino genotipizzato nell'ambito delle attività di sorveglianza secondo il Regolamento 999/2001/CE negli anni 2008 e 2009 per le razze Sarda e Sarda-meticci. Nella razza Bergamasca gli anni di riferimento sono il 2008, 2009 e 2010.

Per le popolazioni ovine di razza Sarda e Sarda-meticci sono stati inseriti nel modello genotipico di popolazione quei genotipi PrP che includono alleli la cui frequenza nella popolazione complessiva nazionale, è superiore all'1% ovvero: ARQ, T<sub>112</sub>ARQ, AT<sub>137</sub>RQ, AF<sub>141</sub>RQ, ARQK<sub>176</sub>, VRQ, AHQ, ARH, ARR (tabella 2.1.2).

Dalla loro combinazione derivano i 45 genotipi considerati nel modello, le cui frequenze iniziali nelle popolazioni Sarda e Sarda-meticci sono riportate in appendice (tabella 3.2.2).

Nella razza Bergamasca oltre a tali alleli è stato incluso anche l'allele ARK. Le frequenze genotipiche che alimentano il modello per la razza Bergamasca sono riportate in appendice (tabella 3.2.3).

### 3.2.3.3 Schema riproduttivo e strategie di selezione genetica per la PrP

Le strategie di selezione sono state testate nel modello per linea maschile e sono state definite con l'intento di simulare i piani di selezione implementati sul territorio nazionale secondo il D.M. 15/12/2004. I genotipi portatori dell'allele ARQ sono stati ulteriormente classificati sulla base della diversa suscettibilità che la presenza o meno delle mutazioni ai codoni 112, 137, 141 e 171 conferisce agli ovini nei confronti della malattia. L'allele ARQ, indicato genericamente come ARQ<sub>x</sub>, è stato classificato in tre gruppi di suscettibilità:

- alleli ARQ<sub>x</sub> associati a resistenza (ARQ<sub>res</sub>); responsabili di suscettibilità minima o nulla degli ovini nel caso in cui si trovino in omozigosi e scarsa in caso di eterozigosi. Includono gli alleli AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub>;
- alleli ARQ<sub>x</sub> associati ad un livello intermedio di suscettibilità (ARQ<sub>int</sub>); conferiscono agli ovini una elevata suscettibilità. Includono gli alleli T<sub>112</sub>ARQ e AF<sub>141</sub>RQ;

- alleli ARQ<sub>x</sub> associati a suscettibilità (ARQ<sub>sus</sub>); responsabili di suscettibilità elevata negli ovini in condizione di omozigosi o eterozigoti con ARQ<sub>int</sub>. Comprendono gli ARQ<sub>x</sub> privi di mutazioni o con mutazioni diverse da quelle sopra riportate.

In sintesi lo schema razionale alla base delle strategie di selezione genetica adottate nel modello genotipico di popolazione è riportato in tabella 3.2.4.

<b>Classe Riproduttori (D.M.2004)</b>	<b>Suscettibilità</b>	<b>Genotipi</b>	<b>Classe Riproduttori (ARQ<sub>x</sub>)</b>	<b>Genotipi</b>	<b>Suscettibilità</b>	<b>Frequenza (%) nella popolazione</b>
<b>1° Classe</b>	minima o nulla	ARR/ARR	<b>1° Classe</b>	ARR/ARR	minima o nulla	<b>14,4</b>
<b>2° Classe</b>	scarsa	ARR/ARH ARR/AHQ ARQ/ARR	<b>2° Classe</b>	ARR/ARH ARR/AHQ ARQ <sub>res</sub> /ARR ARQ <sub>int</sub> /ARR ARQ <sub>sus</sub> /ARR	scarsa	<b>43,9</b>
<b>3° Classe</b>	elevata	ARQ/ARQ ARQ/AHQ AHQ/AHQ ARQ/ARH ARH/ARH AHQ/ARH	<b>3.a</b>	ARQ <sub>res</sub> /ARQ <sub>res</sub>	minima o nulla	<b>0,3</b>
			<b>3.b</b>	ARQ <sub>res</sub> /ARQ <sub>int</sub> ARQ <sub>res</sub> /ARQ <sub>sus</sub> ARQ <sub>res</sub> /AHQ ARQ <sub>res</sub> /ARH	scarsa	<b>3,3</b>
			<b>3.c</b>	ARQ <sub>int</sub> /ARQ <sub>int</sub> ARQ <sub>int</sub> /AHQ ARQ <sub>int</sub> /ARH ARQ <sub>sus</sub> /ARQ <sub>int</sub> ARQ <sub>sus</sub> /AHQ ARQ <sub>sus</sub> /ARH AHQ/AHQ AHQ/ARH ARH/ARH	elevata	<b>12,6</b>
			<b>3.d</b>	ARQ <sub>sus</sub> /ARQ <sub>sus</sub>	elevata	<b>22,3</b>
<b>Divieto d'impiego</b>	elevata (VRQ/ARR: scarsa)	VRQ/VRQ VRQ/ARQ VRQ/ARH VRQ/AHQ VRQ/ARR	<b>Divieto d'impiego</b>	VRQ/VRQ VRQ/ARQ <sub>res</sub> VRQ/ARQ <sub>int</sub> VRQ/ARQ <sub>sus</sub> VRQ/ARH VRQ/AHQ VRQ/ARR	elevata (VRQ/ARR: scarsa)	<b>3,2</b>

**Tabella 3.2.4** – Classificazione dei genotipi portatori dell'allele ARQ<sub>x</sub> all'interno delle classi riproduttive del D.M. 15/12/2004 e relativa frequenza nella popolazione ovina generale.

Non sono state differenziate ulteriori sottoclassi, che tengano conto della diversa suscettibilità genetica dell'ARQ<sub>x</sub>, per la classe 2° e Divieto d'impiego, trattandosi nel primo caso di genotipi in eterozigosi con l'allele ARR, genotipi a suscettibilità scarsa, e nel secondo di genotipi il cui utilizzo in selezione genetica è vietato dalla normativa EU.

Le strategie di riproduzione, definite sulla selezione o meno dei caratteri di resistenza genetica degli ovini alla scrapie, sono 7 (indicati con le lettere a-g; tabella 3.2.5). La prima di queste (a) permette di valutare l'andamento della malattia nelle tre popolazioni in condizioni naturali senza alcun intervento selettivo. Le strategia successiva (b) rispecchia l'applicazione delle minime norme richieste dall'Unione Europea (999/2001) e vieta di riprodurre arieti portatori dell'allele VRQ. Le strategie seguenti (c, d, e, f) aggiungono alle precedenti

l'esclusione dalla riproduzione della classe 3.d, seguita poi dalla 3.c, 3.b, 3.a, 2°, fino quindi ad operare la selezione genetica solo con arieti di classe 1° (g).

Questa ultima strategia è per definizione la più efficace ed è pertanto considerata la strategia di riferimento rispetto alla quale è interessante confrontare l'efficacia delle altre nella produzione dell'*outcome*.

<b>Schema riproduttivo</b>		
<b>Strategie riproduttive</b>		<b>Classi di riproduttori ammesse in riproduzione*</b>
<i>nessun intervento selettivo della PrP</i>	<i>a</i>	1°, 2°, 3° e Divieto di impiego
<i>strategie di selezione genetica della PrP</i>	<i>b</i>	1°, 2° e 3°
	<i>c</i>	1°, 2°, 3.a, 3.b, 3.c
	<i>d</i>	1°, 2°, 3.a, 3.b
	<i>e</i>	1°, 2° e 3.a
	<i>f</i>	1° e 2°
	<i>g</i>	1°

\* le classi di riproduttori sono quelle definite in tabella 3.2.4

**Tabella 3.2.5** – Schema riproduttivo: strategie riproduttive testate nel modello genotipico di popolazione con relative classi di riproduttori ammesse in selezione.

Le frequenze genotipiche degli arieti che alimentano il modello per le tre popolazioni ovine e per ciascuna delle 7 strategie riproduttive sono riportate in appendice (tabelle 3.2.6; 3.2.7, 3.2.8). Con l'intento di rendere più immediata la comprensione di come la presenza di un allele cambi nelle diverse strategie, sono di seguito riportate (tabell3 3.2.9, 3.2.10, 3.2.11) le frequenze in termini di alleli sempre per le tre popolazioni e per le strategie riproduttive testate nel modello.

<b>Alleli arieti</b>	<b>Strategia riproduttiva</b>							<b>totale (%)</b>
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	
ARQ	44,9	45,0	31,2	29,4	29	29,1	-	100
AF <sub>141</sub> RQ	4,9	5	6,2	2,9	2,5	2,5	-	100
T <sub>112</sub> ARQ	0,5	0,5	0,6	0,1	0,1	0,1	-	100
VRQ	0,2	-	-	-	-	-	-	100
AHQ	4,5	4,6	5,7	3,2	2,6	2,7	-	100
ARH	0,2	0,2	0,2	0	0	0	-	100
ARQK <sub>176</sub>	4,1	4,1	5,1	5,9	3,5	3,4	-	100
AT <sub>137</sub> RQ	2,6	2,6	3,2	3,7	2,1	1,8	-	100
ARR	38,2	38,2	47,8	54,8	60,1	60,4	199	100

**Tabella 3.2.9** – Frequenze alleliche (valori percentuali) degli arieti per le strategie riproduttive nella razza Sarda

<i>Alleli arieti</i>	<i>Strategia riproduttiva</i>							<i>totale (%)</i>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	
ARQ	44,8	45,3	31,1	29,1	28,6	28,7	-	100
AF <sub>141</sub> RQ	4,6	4,7	5,9	2,7	2,5	2,5	-	100
T <sub>112</sub> ARQ	1,0	1,0	1,2	0,4	0,4	0,4	-	100
VRQ	0,9	-	-	-	-	-	-	100
AHQ	4,5	4,6	5,8	2,9	2,5	2,5	-	100
ARH	1,1	1,0	1,3	0,5	0,5	0,5	-	100
ARQK <sub>176</sub>	3,4	3,4	4,3	5,1	3,0	3,0	-	100
AT <sub>137</sub> RQ	1,9	2,0	2,5	2,9	1,7	1,4	-	100
ARR	37,9	38,0	47,9	56,5	60,9	61,1	100	100

**Tabella 3.2.10** – Frequenze alleliche (valori percentuali) degli arieti per le strategie riproduttive nella popolazione Sarda-meticci.

<i>Alleli arieti</i>	<i>Strategia riproduttiva</i>							<i>totale (%)</i>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	
ARQ	58,2	62,5	38,9	30	30	30	-	100
AF <sub>141</sub> RQ	8,2	8,0	13,0	-	-	-	-	100
T <sub>112</sub> ARQ	3,1	3,4	5,6	-	-	-	-	100
VRQ	6,1	-	-	-	-	-	-	100
AHQ	9,2	10,2	16,7	10	10	10	-	100
ARH	3,1	2,3	3,7	-	-	-	-	100
ARQK <sub>176</sub>	-	-	0	-	-	-	-	100
AT <sub>137</sub> RQ	-	-	0	-	-	-	-	100
ARR	12,2	13,6	22,2	60	60	60	100	100

**Tabella 3.2.11** – Frequenze alleliche (valori percentuali) degli arieti per le strategie riproduttive nella razza Bergamasca.

Si è assunto che le frequenze genotipiche degli arieti in assenza di selezione non differiscano da quelle della popolazione generale. Nel passaggio da una strategia riproduttiva alla successiva, la frequenza dei genotipi non più ammessi in riproduzione è stata distribuita alla frequenza dei restanti genotipi.

### 3.3 Modello di trasmissione tra animali

#### 3.3.1 Razionale

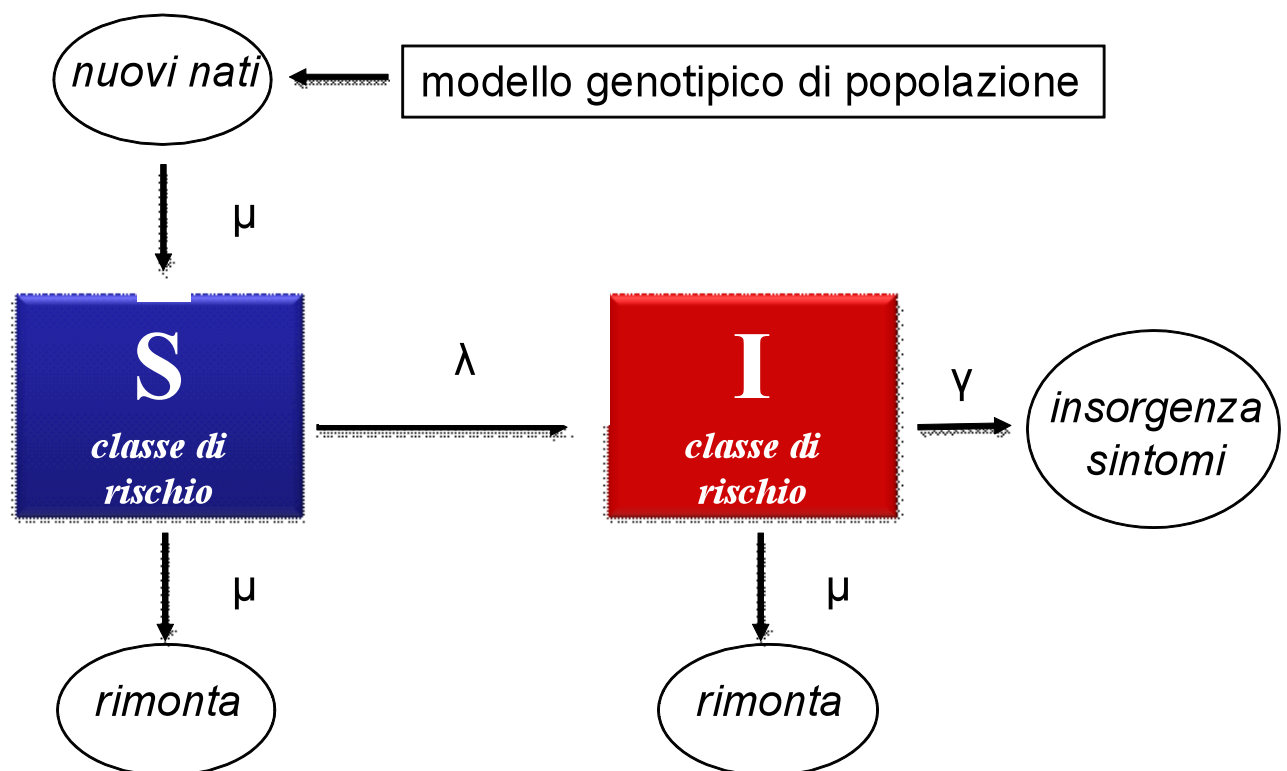
Il modello di trasmissione della scrapie tra animali valuta, sulla base delle condizioni di diffusione della malattia e delle caratteristiche genotipiche degli ovini, il valore del numero riproduttivo di base tra animali ( $R_0^{ba}$ ).  $R_0^{ba}$  fornisce indicazioni relative alla capacità di trasmissione della scrapie da un animale infetto ad uno sano, nella popolazione considerata.

Il modello stima annualmente e lungo un arco di tempo di 50 anni, il valore di  $R_0^{ba}$  nella popolazione ovina a livello di unità animali, nei diversi scenari riproduttivi considerati e

precedentemente descritti. Il raggiungimento della condizione  $R_0^{ba} < 1$  corrisponde all'eliminazione progressiva della scrapie dalla popolazione considerata per mancanza di un numero critico di animali suscettibili all'infezione, tale per cui gli ovini ancora suscettibili ne risultano indirettamente protetti.

### 3.3.2 Struttura

La dinamica di diffusione della scrapie nella popolazione ovina ospite è stata descritta con un modello compartimentale di tipo Suscettibile-Infetto (S-I) con demografia, deterministico ed eterogeneo per classi di rischio. Nei due compartimenti gli ovini sono stati stratificati in classi di suscettibilità, sulla base del genotipo PrP di appartenenza che gli conferisce un diverso rischio di acquisizione della malattia ovvero una diversa probabilità di passare dal comparto degli animali suscettibili a quello degli infetti. Il diagramma di flusso del modello S-I è rappresentato in figura 3.3.1:



**Figura 3.3.1-** Diagramma di flusso del modello S-I che illustra la dinamica di diffusione della scrapie tra ovini. S - animali suscettibili all'infezione; I - animali infetti;  $\mu$  - tasso di rimonta;  $\lambda_i$  - forza di infezione;  $\gamma_i$  - tasso di insorgenza della sintomatologia clinica.

Le assunzioni del modello così sviluppato sono che tutti i nuovi nati, la cui distribuzione genotipica PrP è stimata di anno in anno con il modello genotipico di popolazione, sono

suscettibili all'infezione, ad eccezione della classe di rischio resistente (vedi oltre). Gli ovini risultano quindi suscettibili alla scrapie dalla nascita fino al momento in cui vengono eliminati dal compartimento S, secondo il tasso di rimonta ( $\mu$ ) o perché acquisiscono la malattia a seguito del contatto diretto con un animale infetto ( $\lambda_i$ ). Acquisita l'infezione passano nel compartimento degli infetti e sono a loro volta in grado di trasmettere la malattia. Gli animali infetti sono rimossi dal compartimento I secondo il tasso di rimonta o a seguito dell'insorgenza della sintomatologia clinica ( $\gamma_i$ ). In quest'ultimo caso si assume che all'interno dell'unità allevamento non vengano attuate le misure previste dal Reg. 999/2001/CE sulla gestione dei focolai.

In termini matematici il numero di individui presenti nei compartimenti S e I, denotati rispettivamente  $X(t)$ ,  $Y(t)$  e per ciascuna classe di rischio  $i$  viene definito impostando una equazione differenziale in funzione del tempo, per ognuno dei due compartimenti:

$$\frac{dX_i}{dt} = f_i \left( \mu N_i + \sum_j \gamma_j Y_j \right) - (\mu + \lambda_i) X_i \quad (1)$$

$$\frac{dY_i}{dt} = \lambda_i X_i - (\mu + \gamma_i) Y_i \quad (2)$$

dove  $\mu$  è il tasso di rimonta,  $N_i$  la numerosità della classe  $i$ ,  $\gamma_j$  e  $Y_j$  rispettivamente il tasso di insorgenza dei sintomi e il numero di individui infetti nelle classi di rischio  $j$  (inclusa la  $i$ ),  $\lambda_i$  è la forza di infezione (FOI) per la classe di rischio  $i$ ,  $\gamma_i$  è il tasso di insorgenza della sintomatologia clinica specifico per classe di rischio.

La FOI regola il passaggio dal compartimento dei suscettibili a quello degli infetti e rappresenta la probabilità nell'unità di tempo che un individuo suscettibile divenga infetto (de Jong *et al.*, 1995) ovvero equivale a ciò che in epidemiologia viene definito con il termine di "incidenza" (Anderson e May, 1992).

Ciascun individuo ha quindi una diversa probabilità di acquisire la malattia in funzione della classe di rischio cui appartiene ovvero del genotipo PrP di cui è portatore. E' stato assunto che la scrapie sia trasmissibile tra animali appartenenti alla stessa classe ma anche ad altre classi di rischio e che queste differiscano solo nella suscettibilità all'infezione e non nel grado di infettività che caratterizza gli ovini una volta acquisita l'infezione.

La FOI per classe di rischio è così calcolata:

$$\lambda_i = \beta r_i \sum_j \frac{Y_j}{N_{tot}} \quad (3)$$

dove  $\beta$  è il tasso di contatto tra animali classe indipendente (la probabilità che due ovini vengano in contatto è quindi indipendente dal loro genotipo) e  $r_i$  il rischio che un ovino di classe  $i$  acquisisca l'infezione.

Sostituendo l'equazione (3) nella (2) e trovando la soluzione in condizione di equilibrio,

quando  $\frac{dY_i}{dt} = 0, Y_i \neq 0$ , si avrà la seguente espressione analitica per  $\beta$  e  $r_i$ :

$$r_i = \frac{(\mu + \gamma_i) Y_i^* / X_i^*}{(\mu + \gamma_{ref}) Y_{ref}^* / X_{ref}^*} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{(\mu + \gamma_i)}{r_i \sum_j Y_j^* / N_{tot}} \cdot \frac{Y_i^*}{X_i^*} \quad (5)$$

Assumendo una condizione di equilibrio  $(X_i^*, Y_i^*)$  e conoscendo la prevalenza della malattia tra gli ovini è possibile stimare il numero di animali infetti come segue:

$$Y_i^* = Y_{i\_data} / Se \quad (6)$$

$$X_i^* = N_i \left( 1 + \frac{1}{\mu N_{tot}} \sum_j \gamma_j Y_j^* \right) - Y_i^* \left( 1 + \frac{\gamma_i}{\mu} \right) \quad (7)$$

dove con  $Y_{i\_data}$  si indica il numero di casi di scrapie occorsi nella popolazione, corretto per la sensibilità  $Se$  del sistema di rilevamento dei casi di malattia sul territorio (sistema di sorveglianza).

In una popolazione eterogenea, in cui non tutti gli individui hanno la stessa probabilità di acquisire l'infezione,  $R_0$  viene calcolato come l'autovalore dominante della *next-generation matrix*  $M^{ng}$  (Diekmann e Heesterbeek, 2000), la cui struttura dipende dal numero delle classi di rischio presenti.

Gli elementi della matrice  $M^{ng}$  rappresentano il numero di nuove infezioni generate in una classe di rischio ( $i$ ) da un ovino infetto appartenente alla stessa o a un'altra classe di rischio ( $j$ ) durante il suo periodo infettante.



Come precedentemente riportato, nel modello di trasmissione tra animali sono state identificate quattro classi di rischio ( $h, m, l$  e  $z$ ), la cui composizione e i criteri di scelta sono descritti nel paragrafo seguente.  $R_0$  tra animali ( $R_0^{ba}$ ) è quindi calcolato come segue:

$$M^{ng} = \beta \begin{pmatrix} \frac{r_h f_h}{(\gamma_h + \mu)} & \frac{r_h f_h}{(\gamma_m + \mu)} & \frac{r_h f_h}{(\gamma_l + \mu)} & \frac{r_h f_h}{(\gamma_z + \mu)} \\ \frac{r_m f_m}{(\gamma_h + \mu)} & \frac{r_m f_m}{(\gamma_m + \mu)} & \frac{r_m f_m}{(\gamma_l + \mu)} & \frac{r_m f_m}{(\gamma_z + \mu)} \\ \frac{r_l f_l}{(\gamma_h + \mu)} & \frac{r_l f_l}{(\gamma_m + \mu)} & \frac{r_l f_l}{(\gamma_l + \mu)} & \frac{r_l f_l}{(\gamma_z + \mu)} \\ \frac{r_z f_z}{(\gamma_h + \mu)} & \frac{r_z f_z}{(\gamma_m + \mu)} & \frac{r_z f_z}{(\gamma_l + \mu)} & \frac{r_z f_z}{(\gamma_z + \mu)} \end{pmatrix} \quad (8)$$

dove  $f_h, f_m, f_l, f_z$  sono le frequenze delle classi di rischio  $h, m, l$  e  $z$ .

### 3.3.3 Dati e fonte dati

#### 3.3.3.1 Classi di rischio: rischio e periodo di incubazione

Nel modello S-I, gli ovini sono stratificati in classi di rischio, sulla base del genotipo PrP di appartenenza. Le classi intendono rappresentare i diversi livelli di suscettibilità degli animali alla scrapie in base al loro genotipo.

Tale categorizzazione è stata ottenuta valutando le evidenze disponibili da studi sperimentali di trasmissione della scrapie *in vivo* (Vaccari *et al.*, 2007 e Cosseddu *et al.*, 2007), da uno studio osservazionale mirato a stimare, attraverso dati di sorveglianza, il rischio di scrapie genotipo specifico (Ciaravino, dati non pubblicati) e da alcune informazioni sui casi di malattia riportate nell'ambito del sistema di sorveglianza nazionale delle EST nei piccoli ruminanti.

I criteri che hanno permesso di raggruppare i genotipi PrP nelle classi di rischio sono diversi e hanno riguardato:

- la presenza o meno dei genotipi nei casi naturali di malattia in Italia;
- il rischio indiretto genotipo-specifico associato agli ovini, valutato con il calcolo degli Odds Ratio (OR);
- la presenza di segni clinici di malattia in animali sperimentalmente infetti per via orale (OS) e intracerebrale (IC);
- la durata del periodo di incubazione in ovini naturalmente e sperimentalmente infetti;
- il ritrovamento della PrP<sup>sc</sup> in diversi organi e tessuti del sistema linfo-reticolare (SLR), quale *proxy* della possibile capacità infettante genotipo dipendente.

I genotipi categorizzati nella classe a elevato rischio di malattia, denotata con  $h$  (tabella 3.3.3.1) sono quelli che: in condizioni naturali rappresentano la maggior parte dei casi di scrapie (78%), risultano sintomatici con età mediana di 36 mesi e rispetto ai quali nessun altro genotipo conferisce un rischio maggiore di malattia. In condizioni sperimentali sono caratterizzati da tempi di incubazione brevi dopo infezione per OS e per IC, in seguito alla quale viene rilevata la presenza di PrPsc nel tessuto SLR. In classe  $h$  è pertanto presente il genotipo ARQsus/ARQsus.

I genotipi raggruppati nella classe definita a media suscettibilità, denotata come  $m$  (tabella 3.3.3.1) sono presenti nei casi naturali di malattia (21%), tra i quali si rileva la presenza di casi sintomatici con un'età mediana di 48 mesi e risultano meno a rischio d'infezione rispetto ai genotipi classe  $h$  (OR ~0,5). Dopo infezione per OS e per IC manifestano segni clinici di malattia, a seguito di un periodo di incubazione superiore rispetto ai genotipi di classe  $h$ , e sono caratterizzati da ritrovamento della PrPsc nel SLR dopo infezione per IC. Tutti i genotipi privi degli alleli ARH, ARR, e ARQres e con un solo allele ARQsus sono raggruppati in classe  $m$ .

I genotipi categorizzati nella classe a bassa suscettibilità, denotata con  $l$  (tabella 3.3.3.1) sono quasi assenti nei casi naturali d'infezione (0,1%), mai sintomatici e presentano un rischio di malattia significativamente inferiore rispetto alla classe  $h$  (OR ~0,04). In condizioni sperimentali manifestano segni clinici solo dopo infezione per IC, in seguito alla quale non è stata riscontrata PrP<sup>sc</sup> nel SLR. Il periodo di incubazione è superiore sia ai genotipi in classe  $h$  che  $m$ . Sono classificati in classe  $l$  i genotipi con almeno un allele ARH ma non in combinazione con gli alleli ARR o ARQres.

Sono considerati non suscettibili all'infezione e classificati in classe  $z$  (tabella 3.3.3.1) tutti quei genotipi che nei casi naturali di malattia sono quasi assenti e non sintomatici e che hanno un rischio significativamente inferiore rispetto alla classe  $h$  (OR ). In condizioni sperimentali non si ammalano né per OS né per IC e pertanto, a seguito di quest'ultima, non si rileva PrPsc nel SLR. In classe  $z$  sono presenti i genotipi che contengono almeno un allele ARR o ARQres

Classe di rischio	Genotipi PrP	Sorveglianza ufficiale delle EST nei piccoli ruminati				Studio osservazionale	Studio sperimentale		
		Casi sintomatici		Frequenza dei genotipi PrP nella popolazione (%)		OR	Tempo di incubazione in mesi		Presenza della PrP <sup>sc</sup> in LRS
Presenza	Mediana età	Casi	Controlli		OS	IC	IC		
<i>h</i>	ARQ <sub>sus</sub> /ARQ <sub>sus</sub>	+	36	77,9	22,3	1	27,8	15,4	+
<i>m</i>	ARQ <sub>sus</sub> /ARQ <sub>int</sub>	+	48	21,4	12,7	~0,5	37	23,2	+
	ARQ <sub>sus</sub> /AHQ								
	ARQ <sub>sus</sub> /VRQ								
<i>l</i>	ARH/ARQ	-	-	0,1	1,8	~0,04	-	36	-
	ARH/ARQ <sub>int</sub>								
	ARH/ARQ <sub>sus</sub>								
	ARH/AHQ								
<i>z</i>	ARH/VRQ	-	-	0,6	63,2	~0,002	-	-	-
	ARR/ARR								
	ARR/ARH								
	ARR/AHQ								
	ARR/VRQ								
	ARR/ARQ <sub>res</sub>								
	ARR/ARQ <sub>int</sub>								
	ARR/ARQ <sub>sus</sub>								
	ARQ <sub>res</sub> /ARQ <sub>res</sub>								
	ARQ <sub>res</sub> /ARQ <sub>int</sub>								
	ARQ <sub>res</sub> /ARQ <sub>sus</sub>								

**Tabella 3.3.3.1** – Classificazione di rischio genotipico

E' stato assunto che i genotipi classificati nella stessa classe di rischio conferiscano agli ovini sia la stessa probabilità di acquisire la malattia (FOI) che, una volta infetti, lo stesso periodo di incubazione ( $\gamma$ ). La classe *h*, in quanto classe associata al maggior rischio di acquisire l'infezione, è considerata nella valutazione del rischio nel modello di trasmissione tra animali, la classe di riferimento ( $r_h = 1$ ). Per le classi *m* e *z* la probabilità di acquisire la malattia in condizioni naturali si assume sia pari a zero e vengono quindi trattate nel modello di trasmissione tra animali come classi resistenti ( $r_l = 0$ ;  $r_z = 0$ ).

Il **periodo di incubazione** per le classi *h* e *m* è stato definito esaminando i dati di sorveglianza e sperimentali. Considerando che l'infezione avviene con maggiore probabilità al momento della nascita o nel periodo immediatamente successivo (Andreoletti *et al.*, 2002; Race *et al.*, 2000), l'età all'insorgenza dei sintomi nei casi di malattia riscontrati in sorveglianza attiva corrisponderebbe al periodo di incubazione in animali naturalmente infetti. E' verosimile che tale scelta comporti una sovrastima rispetto al reale tempo d'incubazione della malattia. Ciò è riconducibile al fatto che tale stima non tiene conto del momento in cui è avvenuta realmente l'infezione (alla nascita o successivamente) e del fatto

che, nella realtà, l'insorgenza dei sintomi non coincide con il momento in cui questi sono riconosciuti dall'allevatore e notificati al sistema di sorveglianza. Al contrario, in animali inoculati sperimentalmente per OS, il periodo di incubazione risulta sottostimato (Ryder *et al.*, 2001). È dunque ragionevole ritenere che in condizioni naturali la durata del periodo di incubazione sia compresa tra i tempi registrati dai sistemi di sorveglianza (età media dei casi sintomatici) e quelli risultanti da studi sperimentali.

Nel caso di animali con genotipo VRQ/VRQ, il periodo di incubazione in condizioni naturali e sperimentali è stato indirettamente indagato con il riscontro di un tempo di 10 mesi più breve in animali inoculati rispetto a casi naturalmente infetti (Guillaume *et al.*, 2010.). Sulla base di queste informazioni, nel modello si è scelto di attribuire alla classe di rischio  $h$  un periodo di incubazione ( $\gamma_h$ ) che fosse quello riscontrato negli studi sperimentali aggiungendovi dieci mesi (tabella 3.3.3.2). Lo stesso criterio è stato applicato alla classe di rischio  $m$ , considerando il genotipo ARQ<sub>sus</sub>/AHQ come riferimento di classe. In questo caso il periodo di incubazione ( $\gamma_m$ ) scelto nel modello è maggiore di quello riscontrato negli ovini naturalmente infetti ma l'esiguo numero di casi sintomatici riportati dai sistemi di sorveglianza non permette di validare o meno questo criterio per la classe  $m$ . Tale scelta, oltre ad essere coerente con la precedente, ha un approccio di tipo conservativo, infatti maggiore è il periodo di incubazione minore è il tasso di trasmissione della malattia e il rischio associato alla classe stessa ( $\beta, r_i$ ).

Classe di rischio	Genotipo di riferimento	Casi in sorveglianza		Casi sperimentali		Periodo di incubazione nel modello ( $\gamma_i$ )
		$N$	Età media (mesi)	$N$	Periodo incubazione (mesi)	
$h$	ARQ <sub>sus</sub> /ARQ <sub>sus</sub>	116	39,8	5	27,8	37,8
$m$	ARQ <sub>sus</sub> /AHQ	7	42,9	5	37	47

**Tabella 3.3.3.2** – Periodo di incubazione per le classi di rischio  $m$  e  $h$ , in sorveglianza, *in vivo*, nel modello.

### 3.3.3.2 Prevalenza della scrapie per classe di rischio

La prevalenza della scrapie nelle classi di rischio è un dato indispensabile per stimare quei parametri, quali il tasso di trasmissione ( $\beta$ ) e il rischio di malattia classe specifico ( $r_i$ ), che consentono di calcolare  $R_0^{ba}$ .

Le fonti dati utilizzate per questa stima sono stati il rapporto annuale sul monitoraggio delle EST nei ruminati, redatto dalla Commissione Europea, per gli anni dal 2005 al 2007 (CE *report*) e i dati di sorveglianza nazionale sulle EST nei piccoli ruminati negli anni dal 2005 al 2009.

La stima della prevalenza di scrapie per classe di rischio ha tenuto in considerazione solamente gli animali regolarmente macellati e notificati al sistema di sorveglianza attiva negli anni 2005, 2006 e 2007. Sono quindi esclusi dalla stima i casi di scrapie riscontrati in corso di eradicazione dei focolai nonché i casi notificati in sorveglianza passiva. Ciò ha garantito una certa omogeneità nella raccolta dati e lo stesso livello di sottonotifica a questi associato.

La numerosità del campione ovino testato per scrapie nella categoria dei regolarmente macellati con un esito negativo deriva dai rapporti annuali sul monitoraggio delle EST nei ruminanti redatti dalla Commissione Europea. La distribuzione per razza e per genotipo della popolazione testata negativa è stata ricostruita a partire dal campione ovino genotipizzato nell'ambito delle attività di sorveglianza secondo il Reg. 999/2001 negli anni 2008 e 2009, assumendo che le caratteristiche della popolazione campionata al macello non siano dissimili da quelle della popolazione italiana.

Il numero massimo possibile di casi per classe di rischio è stato calcolato dal limite superiore al 95% dell'intervallo di confidenza della prevalenza.

Per ciascuna razza la prevalenza e i relativi intervalli di confidenza al 5% e 95% sono stati calcolati con il software R 2.8.1 (*package* epiR). Il numero dei casi all'equilibrio ( $X^*$ ) per popolazione considerata, la popolazione testata (N) divisa per classi di rischio con il calcolo della prevalenza e relativi limiti inferiore e superiore dell'IC al 5% e 95% e il massimo numero di ovini infetti sono riportati nelle seguenti tabelle:

Classe di rischio	Casi di scrapie $X^*$	Campione 600		Popolazione testata	Prevalenza (%)			Numero massimo di casi
		N	f (%)		Prevalenza	Lim. inf.	Lim. sup.	
<i>h</i>	7	126	20,1	13763,2	0,05	0,002	0,1	14,4
<i>m</i>	2	62	9,9	6772,4	0,03	0,008	0,1	7,3
<i>l</i>	1	2	0,3	218,5	0,46	0,8	2,5	5,6
<i>z</i>	-	437	69,7	47734,4	-	-	0,008	3,8
Totale	10	627	100	68488,4	0,015			31,1

**Tabella 3.3.3.2.1** –Numero di casi all'equilibrio per classe di rischio e numero massimo di casi per la popolazione Sarda.

Classe di rischio	Casi	Campione 600		Popolazione testata	Prevalenza (%)			Numero massimo di casi
		N	f (%)		Prevalenza	Lim. inf.	Lim. sup.	
<i>h</i>	24	169	20,3	18670	0,13	0,09	0,19	35,7
<i>m</i>	7	91	11	10053,1	0,07	0,03	0,14	14,4
<i>l</i>	1	12	1,4	1325,7	0,08	0,01	0,43	5,6
<i>z</i>	-	559	67,3	61754,8	-	-	0,01	3,8
Totale	32	831	100	91803,6				44

**Tabella 3.3.3.2.2** – Numero di casi all'equilibrio per classe di rischio e numero massimo di casi per la popolazione Sarda-meticci

<b>Classe di rischio</b>	<b>Casi</b>	<b>Campione 600</b>		<b>Popolazione testata</b>	<b>Prevalenza (%)</b>			<b>Numero massimo di casi</b>
		<i>N</i>	<i>f (%)</i>		<i>Prevalenza</i>	<i>Lim. inf.</i>	<i>Lim. sup.</i>	
<i>h</i>	6	12	36,4	1362,6	0,44	0,2	0,96	13
<i>m</i>	-	12	36,4	1362,6	-	-	0,28	3,8
<i>l</i>	-	3	9,1	340,6	-	-		
<i>z</i>	-	6	18,2	681,3	-	-		
Totale	6	33		3747,1				

**Tabella 3.3.3.2.3** – Numero di casi all’equilibrio per classe di rischio e numero massimo di casi per la popolazione Bergamasca

Poiché la stima della prevalenza ottenuta attraverso i dati di sorveglianza è fortemente influenzata dal livello di sensibilità\* del sistema sono stati ipotizzati e testati nel modello diversi livelli di sensibilità del sistema di sorveglianza (*Se*): 25%, 50% e 75%; il valore di riferimento usato negli scenari del modello è 50%.

### 3.4 Modello di trasmissione tra allevamenti

#### 3.4.1 Razionale

Con il modello di trasmissione della scrapie tra allevamenti viene stimato il numero riproduttivo di base tra allevamenti ( $R_0^{bf}$ ), che rappresenta il numero medio di allevamenti contagiati a partire da un allevamento infetto durante il periodo di persistenza della scrapie al suo interno. Il valore che  $R_0^{bf}$  assume nel tempo considerato nel modello (50 anni), sia in condizioni naturali che sotto diverse ipotesi riproduttive, indica complessivamente se la scrapie persiste nella popolazione con un andamento endemico ( $R_0^{bf} = 1$ ), epidemico ( $R_0^{bf} > 1$ ) o se si verificano le condizioni per la sua eradicazione ( $R_0^{bf} < 1$ ).

Infatti il valore iniziale di  $R_0^{bf}$  cambia in relazione alla proporzione di allevamenti presenti sul territorio che, in conseguenza della selezione genetica, diviene protetta nei confronti della malattia una volta raggiunta la condizione  $R_0^{ba} < 1$ . Tale proporzione è strettamente dipendente dalla strategia di selezione riproduttiva implementata e dal grado di adesione degli allevamenti alla selezione genetica per i caratteri di resistenza alla scrapie.

La popolazione è dunque rappresentata nel modello come insieme di singole unità di allevamento che permangono per tutta la durata del piano, indipendentemente dalla presenza della scrapie al loro interno. È utile sottolineare, da questo punto di vista, che il modello non contempla le attività di eradicazione dei focolai di scrapie (abbattimento parziale o totale degli animali) attualmente previste secondo il vigente Reg. 999/2001/CE.

Un'altra assunzione del modello è stata che la struttura dei contatti tra allevamenti sia omogenea ovvero che ciascun allevamento abbia la stessa probabilità di venire in contatto, attraverso lo spostamento di animali, persone o materiale di qualsiasi natura o tramite la condivisione di pascoli, con una qualsiasi delle altre unità di allevamento nella popolazione.

### 3.4.2 Struttura

$R_0$  tra allevamenti ( $R_0^{bf}$ ) rappresenta il numero medio di focolai secondari che un allevamento infetto causa durante la persistenza della scrapie al suo interno. Assumendo che la presenza della scrapie tra allevamenti sia endemica, al tempo  $t=0$  il valore  $R_0^{bf}$  è calcolato come segue:

$$R_0^{bf}(t=0) = \frac{1}{P^*} \quad (9)$$

dove  $P^*$  è la prevalenza di allevamenti infetti in condizioni di equilibrio endemico.

Assumendo che i contatti tra gli allevamenti siano omogenei, i cambiamenti che  $R_0^{bf}$  subisce nel tempo sono relativi al suo valore iniziale  $R_0^{bf}(t=0)$  e alla frazione di allevamenti protetti ( $F_{prot}$ ), ovvero quegli allevamenti con  $R_0^{ba} < 1$  che aumentano in conseguenza della selezione genetica (9).

$$R_0^{bf}(t) = R_0^{bf}(t=0) \frac{F_{prot}(t)}{F_{prot}(t=0)} \quad (10)$$

Si assume che, prima dell'inizio della selezione genetica,  $R_0^{ba}$  abbia una distribuzione gamma tra allevamenti ( $R_0^{wf}$ ) con media uguale a  $R_0^{ba}(t=0)$  e parametro di forma  $k$  uguale a 2:

$$\begin{aligned} R_0^{wf} &\sim \Gamma(\theta(t=0), k) \\ \theta(t=0) &= \frac{R_0^{ba}(t=0)}{k}; k = 2 \end{aligned} \quad (11)$$

Al tempo iniziale  $t=0$ , la frazione di allevamenti protetti ( $f_{prot}$ ) corrisponde alla proporzione di allevamenti con  $R_0^{wf} < 1$ , data da:

$$f_{prot}(t=0) = F_{\Gamma}(1; \theta(t=0), k)$$

dove  $F_{\Gamma}(x; \theta, k)$  è la funzione di distribuzione cumulativa.

Negli allevamenti che aderiscono ai piani di riproduzione, il valore medio di  $R_0^{wf}$  diminuisce nel tempo, mantenendo sempre una distribuzione gamma con media uguale a  $R_0^{ba}(t)$  e parametro  $k$  uguale a 2:

$$R_0^{wf} \sim \Gamma(\theta(t), k)$$

$$\theta(t) = \frac{R_0^{ba}(t)}{k}; k = 2$$

La frazione complessiva di allevamenti protetti dipende dalla proporzione di allevamenti che pur non aderendo ai piani sono protetti e dalla proporzione di allevamenti che diviene protetta in seguito all'adesione ai piani:

$$F_{prot}(t) = (1 - c) \cdot F_{prot}(t = 0) + c \cdot F(1; \theta(t), k) \quad (12)$$

### **3.4.3 Dati e fonte dati**

#### **3.4.3.1 Prevalenza degli allevamenti infetti**

La prevalenza nazionale di allevamenti infetti da scrapie è stata indirettamente stimata assumendo che la prevalenza tra gli allevamenti in Italia non sia diversa da quella stimata in provincia di Siena, per la quale tale informazione è disponibile.

Questa assunzione trova una sua ragione di essere nella indisponibilità a livello nazionale dell'informazione sull'allevamento di provenienza degli ovini testati per scrapie in sorveglianza attiva con esito negativo; informazione al contrario disponibile per la provincia di Siena.

La prevalenza tra allevamenti della provincia di Siena è stata quindi utilizzata nel modello come rappresentativa di quella nazionale.

La stima della prevalenza è stata ottenuta con due diverse modalità. Dapprima è stata calcolata la stima grezza della prevalenza, ottenuta come proporzione di allevamenti con almeno 1 caso di malattia sul totale degli allevamenti in cui sia stato testato almeno 1 animale in sorveglianza attiva e/o passiva (tabella 3.4.3.1). Si è poi provveduto ad aggiustare questa stima tenendo conto di alcuni fattori che influenzano la probabilità che un allevamento infetto da scrapie sia effettivamente identificato. In particolare si è tenuto conto, per ciascun allevamento positivo, della diversa probabilità di identificare un capo positivo sul totale dei capi testati per ragione di campionamento; negli allevamenti negativi, della probabilità che si tratti in realtà di un falso negativo.



Date le quantità diverse da zero:  $x_i$  ovini positivi per ragione di campionamento  $i$ ,  $n_i$  animali testati per ragione di campionamento  $i$ ,  $Y$  allevamenti con almeno un animale positivo e  $N$  allevamenti con almeno un animale testato per scrapie; si definiscono le probabilità binomiali  $p_i$  e  $P$ :

$$x_i \mid n_i \sim \text{Bin}(n_i, p_i)$$

$$Y \mid N \sim \text{Bin}(N, P)$$

La prevalenza di allevamenti infetti (tabella 3.4.3.1) è stata stimata con il metodo della massima verosimiglianza (MLE). in base alla seguente probabilità che un allevamento sia infetto:

$$P^y \left( \prod_{i=1,2,3} (p_i)^{x_i} (1-p_i)^{n_i-x_i} \right)^{N_{neg.flocks}} \prod_{j=1} \left( P \prod_{i=1,2,3} (1-p_i)^{n_{ji}} + 1 - P \right) \quad (13)$$

	<b>Stima cruda</b>			<b>MLE</b>	
<b>Prevalenza</b>	<b>Lim. inf.</b>	<b>Lim. sup.</b>	<b>Prevalenza (%)</b>	<b>Lim. inf.</b>	<b>Lim. sup.</b>
8,13%	5%	12%	48,48%	2,5%	100%

**Tabella 3.4.3.1** – Stime della prevalenza di allevamenti affetti da scrapie con relativi limiti superiore e inferiore dell'intervallo di confidenza al 5 e 95%.

### 3.4.3.2 Parametro $k$ della distribuzione gamma

E' stata introdotta una fonte di eterogeneità nella trasmissione della scrapie tra allevamenti assumendo che  $R_0^{wf}$  sia gamma distribuito con parametro di forma  $k$  uguale a 2.

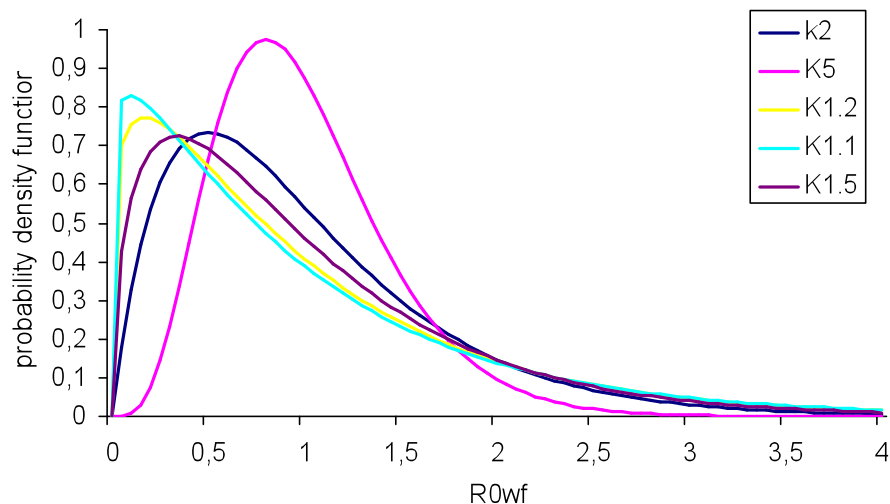
Le informazioni disponibili per valutare il possibile *range* di variazione di  $R_0^{ba}$ , e la forma che la distribuzione assume, provengono da cinque allevamenti infetti della provincia di Siena (Vaccari *et al.*, 2009). Per questi allevamenti erano disponibili informazioni sulla composizione genotipica degli ovini testati per scrapie con esito negativo e positivo, a partire dalle quali sono stati calcolati i valore di  $R_0^{ba}$  riportati in tabella 3.4.3.2.

<b>Allevamento</b>	<b><math>R_0^{ba}</math></b>
A	1,11129
B	1,37498
C	1,78136
D	13,9282
E	2,23337

**Tabella 3.4.3.2** – Valori stimati di  $R_0^{ba}$  in cinque allevamenti affetti da scrapie nella provincia di Siena.

I cinque allevamenti, pur non costituendo un campione rappresentativo degli allevamenti affetti da scrapie nella provincia di Siena, forniscono utili informazioni sulla variabilità di  $R_0^{ba}$  e quindi sulla forma della distribuzione di  $R_0^{wf}$ . I valori calcolati di  $R_0^{ba}$  sono per la maggior parte prossimi a 1, pur variando in un intervallo piuttosto ampio (*range*: 1,1 - 13,9). Questa condizione supporta la possibilità che siano pochi gli allevamenti con valori di  $R_0^{ba}$  estremi ovvero la diffusione della malattia sia supportata da molti allevamenti infetti con una prevalenza intra-allevamento piuttosto bassa.

Sulla base di queste osservazioni si è scelto nel modello come parametro  $k$  di riferimento il valore 2, che conferisce alla curva di distribuzione di  $R_0^{wf}$  la forma riportata in figura 3.4.1 insieme alle curve corrispondenti ai valori 5, 1,2, 1,1 e 1,5 di  $k$ , tutte con media uguale a  $R_0^{ba}$  ( $t=0$ ) nella popolazione di razza sarda.



**Figura 3.4.3.1** – Distribuzione gamma di  $R_0^{wf}$  con media  $R_0^{ba}$  per diversi valori del parametro  $k$  nella razza Sarda.

### 3.5 Analisi della sensibilità

L'analisi della sensibilità misura i cambiamenti di *output* e di *outcome* in conseguenza della variabilità dei parametri che alimentano complessivamente il modello. Permette quindi di valutare quali sono i parametri rispetto ai quali il modello risulta maggiormente sensibile. I parametri inclusi nel modello con i rispettivi valori stimati o ipotizzati e l'incertezza della stima o le possibili ipotesi sul suo valore sono riportati in tabella 3.5.1.

<b>Parametro</b>	<b>Valore nel modello (%)</b>		<b>Valori testati nell'analisi di sensibilità (%)</b>	
	<i>Stimato</i>	<i>Ipotizzato</i>	<i>Stimato</i>	<i>Ipotizzato</i>
Rimozione annuale ovini	- 30		- 25	
Sensibilità complessiva del sistema di sorveglianza		- 50		- 25 - 75
Prevalenza per classe di rischio	- stima puntuale		- limite superiore IC 95%	
Periodo di incubazione per classe di rischio		classe <i>h</i> – 37,8 mesi classe <i>m</i> – 47 mesi	classe <i>h</i> – 27,8**/ 39,8 <sup>#</sup> classe <i>m</i> – 37**/ 42,8 <sup>#</sup>	
Prevalenza di allevamenti infetti	- 8 - stima cruda		-12 - limite superiore IC 95% della stima cruda - 48 - MLE*	
k - distribuzione gamma		- 2		- 1,2
Compliance		- 50		- 25 - 75

\* *Maximum Likelihood Estimation* della prevalenza

\*\* *Fonte sorveglianza EST*

<sup>#</sup> *Fonte studio sperimentale*

**Tabella 3.5.1** – Parametri inclusi nel modello e nell'analisi di sensibilità, con relativi valori

L'analisi della sensibilità è stata condotta considerando un parametro alla volta. Il valore di ogni parametro incluso nel modello è stato variato nel *range* dei possibili valori che esso può assumere, tenendo al contempo fisso il valore di tutti gli altri.

Lo schema secondo cui l'analisi è stata condotta è riportato in tabella 3.5.2. Lo scenario 1, in cui sono riportati i valori di scelta, costituisce lo scenario di riferimento. Negli scenari da 2 a 17 si esplorano le condizioni che corrispondono alla variazione del valore di un parametro alla volta rispetto allo scenario 1, in ordine da sinistra a destra per i valori indicati in tabella 3.5.1.

Scenario	Periodo di incubazione-classe h	Periodo di incubazione-classe m	Sensibilità sorveglianza (%)	Tasso di rimonta (%)	Prev. per classe di rischio	Prev. allevamenti infetti (%)	Compliance (%)	K
1	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi di rischio h e m	8	50	2
2	27,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
3	39,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
4	37,8	37	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
5	37,8	42,8	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
6	37,8	47	25	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
7	37,8	47	75	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
8	37,8	47	50	25	stima puntuale per le classi h e m	8	50	2
9	37,8	47	50	30	limite superiore classe h, stima puntuale classe m	8	50	2
10	37,8	47	50	30	stima puntuale classe h, limite superiore classe m	8	50	2
11	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	2	50	2
12	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	12	50	2
13	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	48	50	2
14	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	25	2
15	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	75	2
16	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	80	2
17	37,8	47	50	30	stima puntuale per le classi h e m	8	50	1,2

**Tabella 3.5.2** – Schema secondo cui è stata condotta l’analisi della sensibilità. Lo scenario 1 è stato considerato lo scenario di riferimento.

E’ stata valutata la differenza nell’*output* e nell’ *outcome* tra gli scenari così ottenuti e lo scenario 1 di riferimento.

## IV - RISULTATI

### 4.1 Modello

I risultati del modello sono riportati in termini di *output* e *outcome*.

L'output complessivo del modello è il tempo  $t$  al quale si realizza la condizione indispensabile all'eradicazione della scrapie ( $R_0^{bf} < 1$ ). Esso permette di valutare se l'attuazione di una strategia selettiva sotto diversi scenari comporta l'eliminazione della malattia dalla popolazione ovina complessiva, ovvero se tale strategia risulta efficace nell'eradicare la scrapie in un determinato lasso di tempo (nel nostro caso 50 anni).

Il confronto tra le diverse strategie selettive, in termini di efficacia, viene attuato comparando il tempo necessario a creare la condizione per l'eradicazione, sotto diversi schemi selettivi e scenari riproduttivi, rispetto alla strategia più efficace ovvero la strategia selettiva  $g$ , che seleziona la PrP nella popolazione ovina con arieti ARR/ARR. Tale risultato che costituisce l'*outcome* finale del modello permette, dunque, di valutare quanto minore è l'efficacia di ciascuna strategia selettiva rispetto alla strategia più efficace.

*Output* e *outcome* sono riportati per ciascuna strategia riproduttiva testata nelle tre popolazioni, nei diversi scenari possibili di prevalenza iniziale della scrapie tra le unità allevamento (8%; 12%; 48%) e in funzione del livello ipotizzato di *compliance* degli allevatori al piano di selezione.

#### 4.1.1 Tempi di eradicazione della scrapie nei diversi scenari selettivi (*Output*)

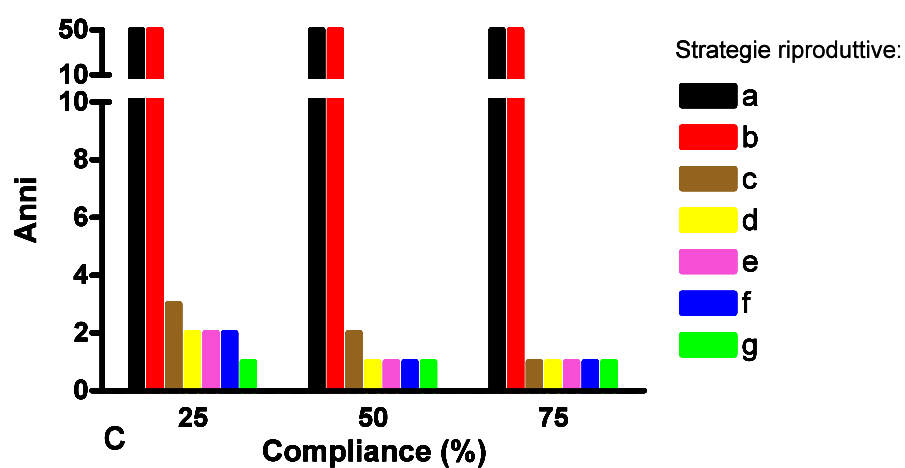
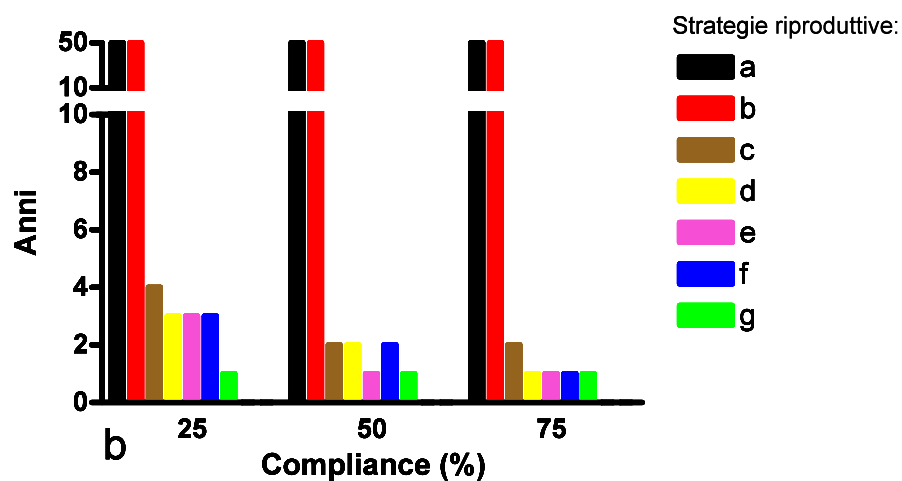
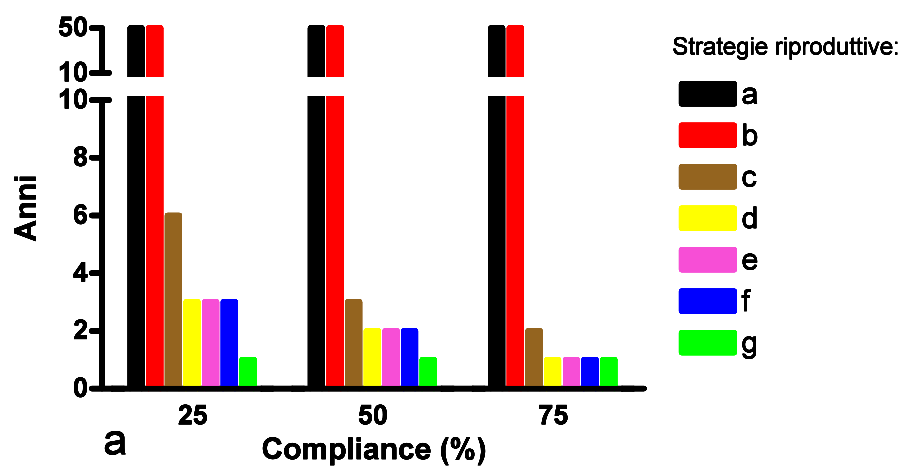
I tempi di eradicazione per le strategie riproduttive esaminate nelle tre popolazioni sono riportati in funzione della prevalenza iniziale della scrapie tra allevamenti, la cui stima è stata 8% (figura 4.1.1.1) 12% (figura 4.1.1.2) e 48% (figura 4.1.1.3).

Nei diversi scenari di prevalenza iniziale della scrapie, le strategie di riproduzione  $a$  e  $b$  non consentono di attuare le condizioni per l'eradicazione della scrapie nel tempo considerato dal modello (50 anni) in nessuna delle tre popolazioni ovine ovvero non viene raggiunta la condizione  $R_0^{bf} < 1$ . Pertanto, indipendentemente dal livello di *compliance* ipotizzato, esse risultano inefficaci nell'eradicare la malattia.

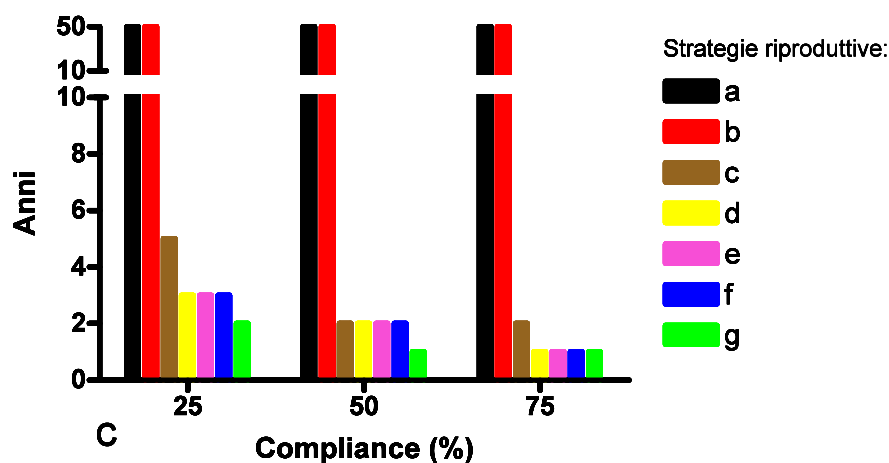
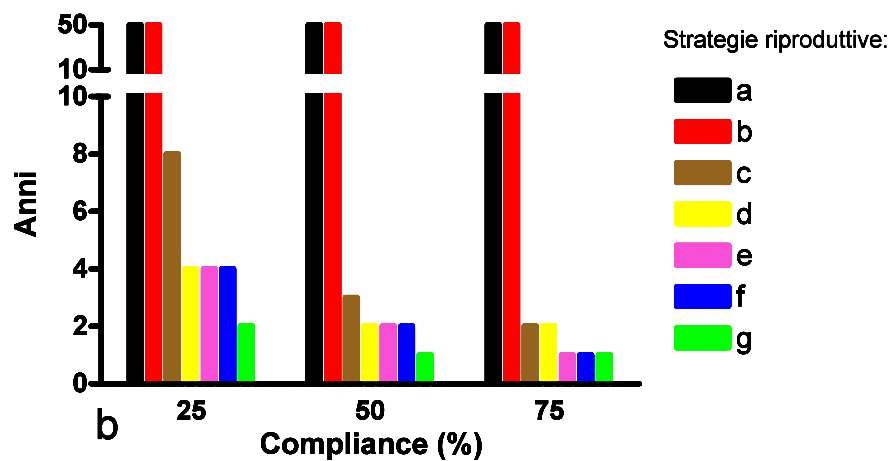
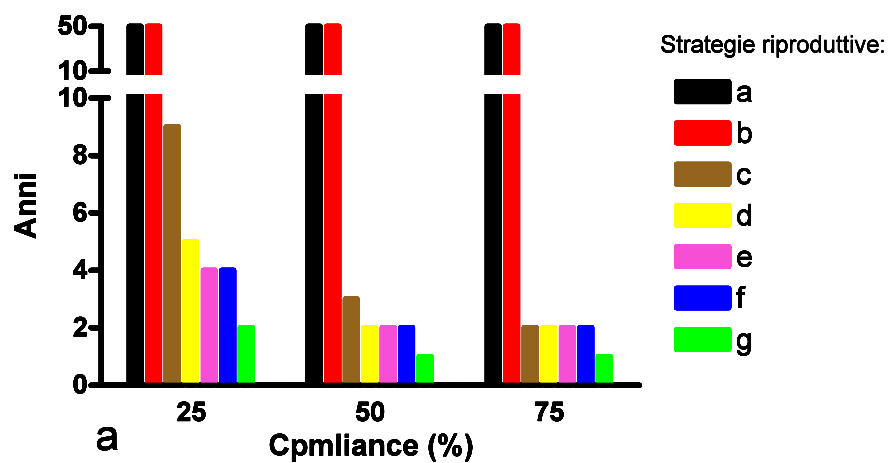
Le strategie selettive, *c*, *d*, *e*, *f* e *g*, sono invece efficaci in tutte le popolazioni seppur con differenze nei valori di *output*, in relazione agli scenari di prevalenza e compliance esaminati nel modello.

Nelle tre popolazioni, in uguali condizioni di prevalenza e di compliance considerati, i tempi di eradicazione per ciascuna strategia assumono valori simili. Si nota, infatti, una tendenza dei tempi di eradicazione a diminuire in corrispondenza dell'aumento del livello di compliance e di diminuzione di prevalenza tra allevamenti, seppur con valori di output complessivamente maggiori nella razza Sarda per tutte le strategie, ad eccezione della strategia *g*.

Nella Bergamasca inoltre si verifica un effetto non evidente negli output, tale per cui all'applicazione della strategia di selezione *b*, non solo non si raggiunge l'eradicazione della malattia ( $R_0^{bf} < 1$ ) ma vi è un progressivo aumento nel tempo del valore di  $R_0^{bf}$ .

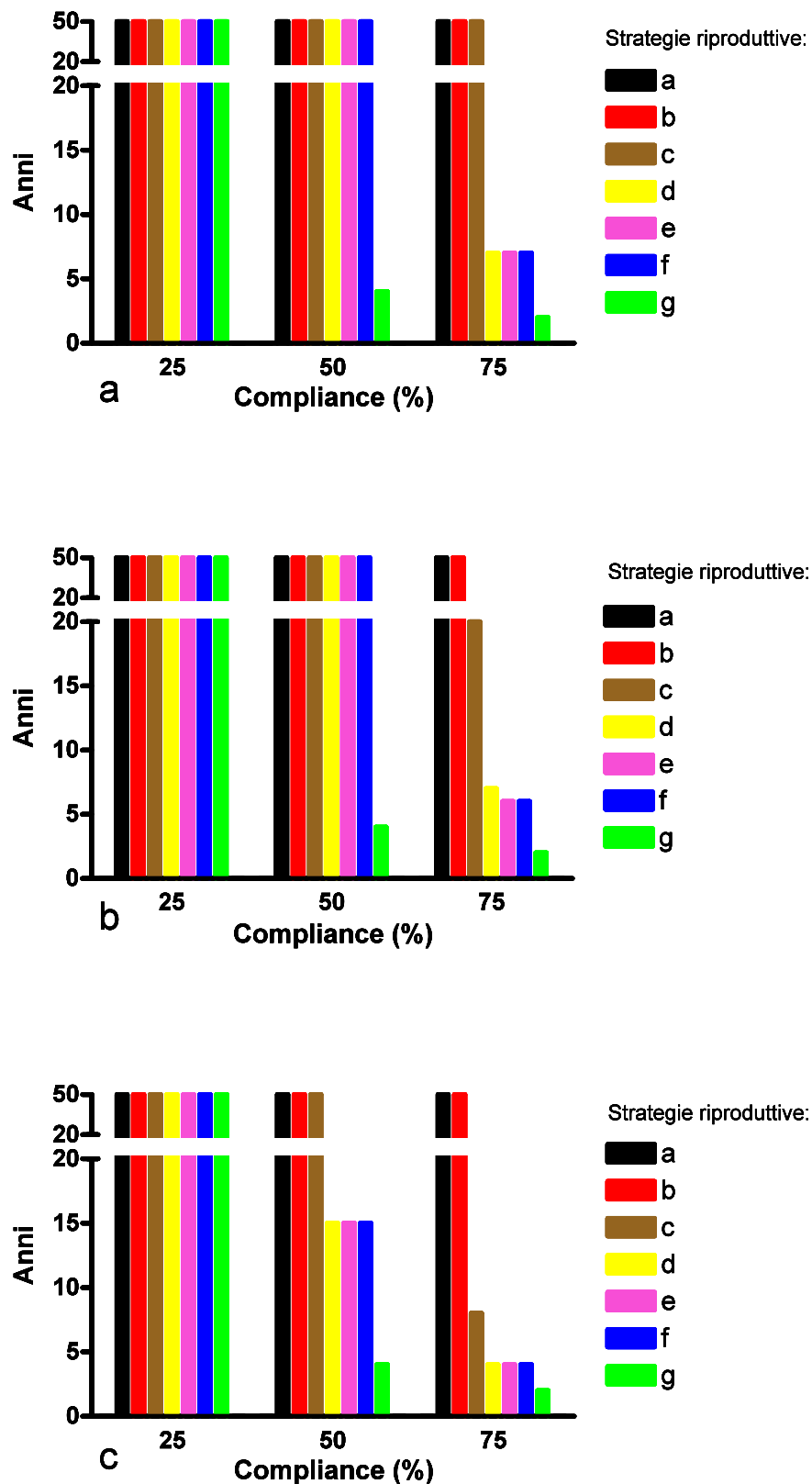


**Figura 4.1.1.1** – Tempi di eradicazione della scrapie per le strategie riproduttive *a, b, c, d, e e f*, in funzione della prevalenza iniziale 8%. A. popolazione Sarda; B. popolazione Sarda-metici; C. popolazione Bergamasca



**Figura 4.1.1.2** – Tempi di eradicazione della scrapie per le strategie riproduttive *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f*, in funzione della prevalenza iniziale 12%. A. popolazione Sarda; B. popolazione Sarda-meticci; C. popolazione Bergamasca





**Figura 4.1.1.3** – Tempi di eradicazione della scrapie per le strategie riproduttive *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f*, in funzione della prevalenza iniziale 48%. A. popolazione Sarda; B. popolazione Sarda-meticci; C. popolazione Bergamasca

### *Prevalenza di allevamenti infetti 8%*

Le strategie di selezione *c*, *d*, *e* *f* e *g* sono efficaci nell'eradicare la malattia dalle tre popolazioni seppur con tempi di eradicazione diversi in funzione del livello di compliance ipotizzato.

La strategia *c* richiede un tempo di eradicazione maggiore rispetto alle altre, soprattutto nella razza Sarda a bassi livelli di compliance (25%). Nella razza Bergamasca la differenza tra i tempi di eradicazione realizzati dalla strategia *c* rispetto alle altre diminuisce fino ad annullarsi completamente man mano che aumenta il livello di adesione degli allevamenti alla selezione. A livelli di compliance del 75% i tempi di raggiungimento della condizione  $R_0^{bf} < 1$  eguagliano quelli della strategia di riferimento *g*.

Nelle tre popolazioni, le tempistiche di eradicazione delle strategie *d*, *e* e *f* sono analoghe, a parità di livello di compliance. Esse equivalgono, nei tempi di eradicazione richiesti, la strategia di riferimento *g* nelle popolazioni Sarda e Sarda-meticci al 75% di compliance, già al 50% nella Bergamasca.

### *Prevalenza di allevamenti infetti 12%*

Gli *output* del modello con una prevalenza iniziale tra allevamenti del 12% non si discostano molto da quelli ottenuti nella condizione di prevalenza 8%, se non per i tempi di eradicazione leggermente più lunghi.

Anche in questo caso tutte le strategie saggiate per i livelli di compliance ipotizzati, sono efficaci, con l'eccezione di *a* e *b*.

La strategia di selezione *c* presenta nelle tre popolazioni un tempo di eradicazione maggiore rispetto alle strategie *d*, *e*, *f*, e *g* soprattutto in condizioni di bassa compliance (25%). Tale differenza risulta più marcata nelle popolazioni Sarda e Sarda-meticcia rispetto alla bergamasca.

Le strategie *d*, *e* e *f* si caratterizzano per tempistiche di eradicazione della scrapie nella maggior parte dei casi uguali per lo stesso livello di compliance in ciascuna popolazione. Nella razza Sarda le strategie *d*, *e* e *f* richiedono tempi di eradicazione sempre superiori rispetto alla strategia *g*. Nella razza Bergamasca eguagliano la strategia *g* al 75% di compliance.

La strategia *g* di riferimento nelle tre popolazioni con compliance 50 e 75% presenta un valore minimo mentre con una bassa compliance il tempo di eradicazione raddoppia.

#### *Prevalenza di allevamenti infetti 48%*

Con un livello di compliance del 25% tutte le strategie considerate, non solo la *a* e *b*, risultano inefficaci nelle tre popolazioni.

Aumentando il livello di compliance (50%) la strategia *g* di riferimento risulta efficace in pochi anni nella Sarda e nella Sarda-meticci nell'eradicare la malattia. Nella stessa condizione ipotizzata di compliance, nella razza Bergamasca sono inoltre efficaci le strategie *d*, *c* e *f*, seppur in un tempo stimato di 15 anni. Con una compliance più elevata (75%) tutte le strategie selettive sono efficaci in pochi anni (fanno eccezione la *a* e *b*) nelle tre popolazioni e la strategia di riferimento permette di eradicare la scrapie in un anno.

#### **4.1.2 Efficacia di eradicazione della scrapie nei diversi scenari selettivi (Outcome)**

Poiché l'efficacia di ciascuna strategia selettiva rispetto a quella più efficace viene valutata come rapporto tra i tempi di eradicazione, non è stato possibile calcolare il valore di *outcome* per quelle strategie di selezione inefficaci o qualora la strategia di riferimento stessa non sia risultata efficace nel periodo considerato dal modello (50 anni). Queste condizioni sono evidenziate nelle tabelle seguenti con il colore rosso. Per le strategie riproduttive che risultano meno efficaci della strategia di riferimento *g*, il valore di *outcome* è evidenziato in arancione mentre è verde nel caso in cui una strategia presenti la stessa efficacia in termini di tempo della strategia di riferimento.

Gli *outcome* per le strategie riproduttive testate nel modello nelle tre popolazioni sono raggruppati in base alla prevalenza iniziale di scrapie tra allevamenti 8% (figura 4.1.2.1), 12 (figura 4.1.2.2), 48% (figura 4.1.2.3) .

a

Compliance (%)	Strategia di selezione genetica						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i> *
25	-	-	5	3	3	3	1
50	-	-	2	2	2	2	1
75	-	-	2	1	1	1	1

b

Compliance (%)	Strategia di selezione genetica						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i> *
25	-	-	4	3	3	3	1
50	-	-	2	2	1	2	1
75	-	-	2	1	1	1	1

c

Compliance (%)	Strategia di selezione genetica						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i> *
25	-	-	3	2	2	2	1
50	-	-	2	1	1	1	1
75	-	-	1	1	1	1	1

*\*strategia di riferimento*

**Figura 4.1.2.1** – Confronto di efficacia tra le strategie riproduttive nella condizione di prevalenza iniziale della malattia 8%. A. Sarda; B. Sarda-meticci; C. Bergamasca.

a

Compliance (%)	Strategia di selezione genetica						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i> *
25	-	-	4,5	2,5	2	2	1
50	-	-	3	2	2	2	1
75	-	-	2	2	2	2	1

b

Compliance (%)	Strategia di riproduzione genetica						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i> *
25	-	-	4	2	2	2	1
50	-	-	3	2	2	2	1
75	-	-	2	2	1	1	1

c

Compliance (%)	Strategia di riproduzione genetica						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i> *
25	-	-	4,5	2,5	2	2	1
50	-	-	3	2	2	2	1
75	-	-	2	2	2	2	1

*\*strategia di riferimento*

**Figura 4.1.2.2** – Confronto di efficacia tra le strategie riproduttive nella condizione di prevalenza iniziale della malattia 12%. A. Sarda; B. Sarda-meticci; C. Bergamasca.

a Compliance (%)	Strategia di riproduzione genetica						
	a	b	c	d	e	f	g*
25	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	1
75	-	-	-	3,5	3,5	3,5	1

b Compliance (%)	Strategia di selezione genetica						
	a	b	c	d	e	f	g*
25	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	1
75	-	-	10	3,5	3	3	1

c Compliance (%)	Strategia di riproduzione genetica						
	a	b	c	d	e	f	g*
25	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	3,75	3,75	3,75	1
75	-	-	4	2	2	2	1

\*strategia di riferimento

**Figura 4.1.2.3** – Confronto di efficacia tra le strategie riproduttive nella condizione di prevalenza iniziale della malattia 48%. A. Sarda; B. Sarda-meticci; C. Bergamasca.

Per le strategie riproduttive *a* e *b* non è stato possibile calcolare l'*outcome*, poiché entrambe risultano non efficaci nelle popolazioni considerate e nelle condizioni di prevalenza tra allevamenti ipotizzate.

#### *Prevalenza di allevamenti infetti 8%*

Nella razza Sarda (figura 4.1.2.1.A), la strategia di selezione *c* risulta sempre meno efficace rispetto a quella di riferimento. A bassi livelli di compliance (25%) è cinque volte meno efficace mentre a livelli medio e alto (50-75%) si presenta solo due volte meno efficace rispetto alla strategia *g*.

Le restanti strategie di selezione ( $d$ ,  $e$ ,  $f$ ) sono 2 o 3 volte meno efficaci in condizioni di bassa o media compliance, mentre ad elevata compliance hanno la stessa efficacia, in termini di tempo, della strategia di riferimento nell'eradicare la scrapie dalla popolazione complessiva.

Nella popolazione Sarda-meticci (figura 4.1.2.1.B) gli *outcome* calcolati per le strategie selettive non si discostano da quelli della Sarda per le stesse strategie di selezione della PrP. L'unica differenza rilevante di *outcome* è nella strategia  $e$ , che già a livelli di media compliance risulta avere la stessa efficacia della strategia di riferimento.

Nella razza Bergamasca (figura 4.1.2.1.C), rispetto alle altre due popolazioni, le strategie selettive risultano complessivamente meno svantaggiose rispetto a quella di riferimento. Infatti la strategia  $c$  pur essendo tre volte meno efficace a bassa compliance e due volte a media compliance, è ugualmente efficace a quella di riferimento con una compliance alta. Le strategie  $d$ ,  $e$ ,  $f$  eguagliano l'efficacia di quella di riferimento da un livello di compliance del 50% in avanti.

#### *Prevalenza di allevamenti infetti 12%*

Nella razza Sarda (figura 4.1.2.2.A) e in quella Bergamasca (figura 4.1.2.2.C), ai livelli di compliance ipotizzati, le strategie selettive testate nel modello non risultano mai efficaci quanto la strategia di riferimento. Gli *outcome* delle due razze si equivalgono, circa 2 volte meno efficaci per le strategie  $d$ ,  $e$  e  $f$ , indipendentemente dalla compliance, e da 4 a 2 volte per la strategia  $c$ , aumentando il livello di compliance.

Nella popolazione Sarda-meticci (figura 4.1.2.2.B) si rilevano differenze rispetto alle altre popolazioni solo per le strategie  $e$  e  $f$  con valore di compliance del 75%. In questi scenari le due strategie selettive sono efficaci quanto quella di riferimento.

#### *Prevalenza di allevamenti infetti 48%*

In una condizione di prevalenza della scrapie tra allevamenti elevata qual è quella considerata dallo scenario del 48%, nessuno schema selettivo, inclusa la strategia basata sull'uso dei soli arieti ARR/ARR è efficace nell'eradicazione della scrapie, con livelli bassi di adesione degli allevamenti alla selezione genetica (compliance=25%). A livelli di compliance superiori, in tutte le popolazioni considerate, nessuna strategia di selezione della PrP risulta efficace quanto quella di riferimento nell'eradicare la malattia, (figura 4.1.2.3). Le strategie  $d$ ,  $e$ ,  $f$  sono efficaci nell'eradicare la scrapie in tutte e tre le popolazioni ma solo a livelli elevati di adesione alla selezione genetica (50% nella bergamasca e 75% nella razza

sarda e meticcia) e comunque con tempi da 2 a 3,5 volte superiori a quanto non si realizzi con la strategia g. La strategia selettiva c è efficace solo a livelli molto elevati di compliance e solo nella Bergamasca e nella Sarda-meticcia (figura 4.1.2.3.B e C), ma con tempi fino a 10 volte superiori rispetto allo schema selettivo g.

## 4.2 Analisi di sensibilità

La sensibilità di *output* e *outcome*, alla variazione delle variabili indipendenti inserite nel modello è illustrata in tabella 4.2.1 per la razza Sarda, in tabella 4.2.2 per la popolazione Sarda-meticci e in tabella 4.2.3 per la razza Bergamasca. La sensibilità è stata valutata per le seguenti variabili: il periodo di incubazione nelle classi di rischio *h* e *m*, sensibilità del sistema di sorveglianza, tasso di rimonta, prevalenza nelle classi di rischio *h* e *m*, prevalenza della scrapie tra allevamenti infetti, compliance e parametro *k*.

<i>Parametri</i>	<i>Scenario</i>	<i>Output</i>							<i>Outcome</i>						
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
<i>Riferimento</i>	1	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Tempo incub. cl. rischio <i>h</i> - <i>Min</i>	2	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Tempo incub. cl. rischio <i>h</i> - <i>Max</i>	3	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Tempo incub. cl. rischio <i>m</i> - <i>Min</i>	4	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Tempo incub. cl. rischio <i>m</i> - <i>Max</i>	5	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Sensibilità sorveglianza- <i>Min</i>	6	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Sensibilità sorveglianza- <i>Max</i>	7	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Tasso di rimonta	8	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1
Preval. cl.rischio <i>h</i> - <i>Max</i>	9	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Preval. cl.rischio <i>m</i> - <i>Max</i>	10	-	-	4	2	2	2	1	-	-	4	2	2	2	1
Preval. tra allevamenti 2% (IC5% of MLE)	11	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1
Preval. tra allevamenti 12% (crude IC95%)	12	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1
Preval. tra allevamenti 48% (MLE)	13	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	1
Compliance- <i>Min</i>	14	-	-	5	3	3	3	1	-	-	5	3	3	3	1
Compliance- <i>Max</i> 1	15	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Compliance- <i>Max</i> 2	16	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
K- quasi esponenziale	17	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1

**Tabella 4.2.1** — Risultati dell'analisi di sensibilità nella popolazione Sarda



<i>Parametri</i>	<i>Scenario</i>	<i>Output</i>							<i>Outcome</i>						
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
<i>Riferimento</i>	1	-	-	2	2	1	2	1	-	-	2	2	1	2	1
Tempo incub. cl. rischio h- <i>Min</i>	2	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Tempo incub. cl. rischio h- <i>Max</i>	3	-	-	2	2	1	2	1	-	-	2	2	1	2	1
Tempo incub. cl. rischio m- <i>Min</i>	4	-	-	2	2	1	2	1	-	-	2	2	1	2	1
Tempo incub. cl. rischio m- <i>Max</i>	5	-	-	2	2	1	2	1	-	-	2	2	1	2	1
Sensibilità sorveglianza- <i>Min</i>	6	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Sensibilità sorveglianza- <i>Max</i>	7	-	-	2	2	1	2	1	-	-	2	2	1	2	1
Tasso di rimonta	8	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1
Preval. cl.rischio h- <i>Max</i>	9	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Preval. cl.rischio m- <i>Max</i>	10	-	-	3	2	1	1	1	-	-	3	2	1	1	1
Preval. tra allevamenti 2% (IC5% of MLE)	11	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1
Preval. tra allevamenti 12% (crude IC95%)	12	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1
Preval. tra allevamenti 48% (MLE)	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Compliance- <i>Min</i>	14	-	-	4	3	3	3	1	-	-	4	3	3	3	1
Compliance- <i>Max1</i>	15	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Compliance- <i>Max2</i>	16	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1
K- <i>quasi esponenziale</i>	17	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1

**Tabella 4.2.2** – Risultati dell’analisi di sensibilità nella popolazione Sarda-meticci

<i>Parametri</i>	<i>Scenario</i>	<i>Output</i>							<i>Outcome</i>						
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
<i>Riferimento</i>	1	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Tempo incub. cl. rischio h- <i>Min</i>	2	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Tempo incub. cl. rischio h- <i>Max</i>	3	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Tempo incub. cl. rischio m- <i>Min</i>	4	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Tempo incub. cl. rischio m- <i>Max</i>	5	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Sensibilità sorveglianza- <i>Min</i>	6	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Sensibilità sorveglianza- <i>Max</i>	7	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Tasso di rimonta	8	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1
Preval. cl.rischio h- <i>Max</i>	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preval. cl.rischio m- <i>Max</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preval. tra allevamenti 2% (IC5% of MLE)	11	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1
Preval. tra allevamenti 12% (crude IC95%)	12	-	-	2	2	2	2	1	-	-	2	2	2	2	1
Preval. tra allevamenti 48% (MLE)	13	-	-	-	15	15	15	4	-	-	-	3,8	3,8	3,8	1
Compliance- <i>Min</i>	14	-	-	3	2	2	2	1	-	-	3	2	2	2	1
Compliance- <i>Max1</i>	15	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1
Compliance- <i>Max2</i>	16	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1
K- <i>quasi esponenziale</i>	17	-	-	2	1	1	1	1	-	-	2	1	1	1	1

**Tabella 4.2.3** – Risultati dell’analisi di sensibilità nella popolazione Bergamasca

Il parametro che nelle tre popolazioni sembra influenzare maggiormente i valori di *output* e *outcome* è la prevalenza iniziale di allevamenti affetti da scrapie. Infatti sia nello scenario a bassa prevalenza (2%) che in quello ad elevata prevalenza (48%), i risultati sono sostanzialmente diversi dallo scenario 1 di riferimento. In condizioni di elevata prevalenza iniziale di allevamenti infetti, i tempi di eradicazione, stimati nello scenario di riferimento 1 in 2 anni, assumono nelle popolazioni Sarda e Sarda-meticci valori non finiti ovvero non compresi nei 50 anni in cui agisce il modello.

Nella razza Bergamasca, lo stesso scenario (48% di prevalenza) pur presentando un tempo di eradicazione finito, si discosta visibilmente dai tempi di eradicazione dello scenario 1 e presenta un valore di output quattro volte superiore a quello di riferimento.

Anche la compliance sembra avere un effetto rilevante sui risultati del modello. Infatti la variazione del livello ipotizzato da medio (50%) a basso (25%) rallenta il raggiungimento della condizione di eradicazione  $R_0^{bf} < 1$  mentre livelli più alti (75%) accelerano tale processo, ciò è particolarmente evidente per la strategia selettiva *c*.

I parametri periodo di incubazione, sensibilità del sistema di sorveglianza, ai livelli considerati della nostra analisi, non sembrano invece influenzare i risultati del modello.

Per quanto riguarda l'influenza dei parametri tasso di rimonta, forma della distribuzione esponenziale e prevalenza per classe di rischio, questi non sembrano avere effetti rilevabili sui risultati, se non sulla strategia selettiva *c*.

## V - Discussione

La scrapie rappresenta una problematica sanitaria dell'allevamento ovino in quanto causa di perdite economiche ma anche problema emergente di sanità pubblica. A oggi non esistono evidenze che si tratti di una zoonosi, ma non si esclude con certezza che possa essere causa di infezione nell'uomo (EFSA, 2011). Si sono resi pertanto necessari piani di controllo e di eradicazione della malattia in ambito comunitario.

A causa del lungo periodo di incubazione, della lunga fase preclinica in cui non sono presenti i sintomi della malattia negli ovini e della mancanza di un test *in vivo* il tradizionale approccio usato per il controllo di agenti infettivi, basato sull'applicazione di test diagnostici e trattamento/segregazione/eliminazione dei positivi e, qualora disponibile, sulla vaccinazione dei suscettibili, nel caso della scrapie e delle altre malattie da prioni, non può essere utilizzato.

Tuttavia allo stato attuale delle conoscenze la documentata resistenza alla malattia di ovini portatori di taluni genotipi PrP, fa sì che la selezione genetica possa essere un valido e irrinunciabile strumento di prevenzione e controllo della malattia. È da ricordare, infatti, che i piani di sorveglianza introdotti in EU con il regolamento 999/2001/CE sebbene prevedano l'eradicazione della malattia dagli allevamenti nei quali sono identificati casi di scrapie, non sono primariamente finalizzati al controllo della malattia e sono inefficaci nell'identificare tutti i focolai presenti in un territorio.

E' da notare che i piani di selezione genetica previsti dal Reg. 999/2001, sono stati redatti sulla base della suscettibilità genotipica evidenziata soprattutto in Gran Bretagna (NSP) e concentrano gli sforzi selettivi della PrP verso una selezione negativa per l'allele VRQ, riconosciuto in tale contesto il principale target della malattia negli ovini .

Al fine di valutare l'efficacia delle strategie di controllo ed eradicazione della scrapie in popolazioni ovine sulla base dei piani implementati a livello nazionale sono stati condotti numerosi studi (Kao *et al.*, 2001; Gubbins and Webb, 2005; Gubbins and Roden, 2006; Truscott and Ferguson 2008; Man *et al.*, 2009) che includono diversi schemi di selezione genetica della PrP.

Altri lavori sono stati finalizzati a verificare l'efficacia dei piani di selezione genetica valutando come fossero cambiate, a pochi anni dall'inizio della selezione, non solo le frequenze genotipiche ma anche la prevalenza della malattia (Hagenaars *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2008), nella popolazione ovina.

Poiché la letteratura disponibile riguarda quasi esclusivamente la situazione della Gran Bretagna e dell'Olanda è probabile che essa non sia in grado di dare indicazioni generali sull'andamento dei piani in altri Paesi, come l'Italia, nei quali il quadro epidemiologico della malattia ed il contesto demografico ovino appare assai differente. In Italia infatti non solo l'unico ceppo di scrapie classica circolante ha un target genetico leggermente diverso rispetto a quanto non avvenga nei Paesi del Nord Europa, ma soprattutto la popolazione ovina appare assai differente in termini di tipologia produttiva (prevalgono le razze da latte) e caratteristiche genotipiche della PrP.

Sulla scorta di tali considerazioni il nostro lavoro ha avuto, per primo in Italia, l'obiettivo di verificare e confrontare l'efficacia di diverse strategie riproduttive nell'eradicazione della scrapie classica, con un approccio modellistico simile a quanto già proposto in Gran Bretagna e Olanda, basato sulle evidenze disponibili e che consentisse di cogliere le peculiarità del contesto epidemiologico della scrapie in Italia.

A questo scopo, infatti, tutti i parametri relativi alla demografia della popolazione ovina e alla trasmissione della malattia, usati nel nostro modello, sono stati stimati dai dati zootecnici, dai dati della sorveglianza attiva e passiva condotta in Italia tra il 2004 e il 2007 e da specifici studi sperimentali di trasmissione del ceppo di scrapie presente sul nostro territorio.

Il vantaggio di un approccio complesso alla valutazione delle strategie selettive, derivante dall'uso di un modello matematico, è che esso consente di analizzare l'effetto di opzioni selettive individuate "a priori" sulla base di evidenze scientifiche, applicate ad un contesto demografico noto e specifico. Ciò consente di indirizzare le scelte di controllo della malattia con informazioni predittive che, oltre a individuare quali genotipi PrP debbano essere selezionati a seconda del livello di prevalenza e/o della composizione genotipica di popolazione, definiscano gli obiettivi da fornire nel tempo ai piani di controllo, in termini di adesione e tempistica.

La valutazione di efficacia delle strategie riproduttive ha presupposto il calcolo del parametro  $R_0^{bf}$ , utile indicatore della diffusione di una malattia in una popolazione ospite.

$R_0^{bf}$  è stato calcolato annualmente per un tempo di 50 anni dall'inizio dell'applicazione degli schemi riproduttivi per verificare se l'applicazione della selezione permettesse di raggiungere la condizione  $R_0^{bf} < 1$ , a cui corrisponde l'eradicazione della malattia.

Poiché il valore iniziale di  $R_0^{bf}$  dipende direttamente dal valore di prevalenza della malattia nella popolazione, il modello è stato sviluppato usando diverse stime della prevalenza tra allevamenti, ottenute con metodi differenti. Tali stime differiscono notevolmente tra loro. La

stima grezza della prevalenza restituisce un valore pari all'8%. Tale dato essendo basato sullo schema di campionamento della sorveglianza che non tiene conto della struttura stratificata della popolazione, comporta un livello di incertezza notevole che porta ragionevolmente a pensare che possa essere fortemente sottostimato. Per contro la stima fornita tramite il MLE è pari a 48% e risulta poco indicativa, poiché identifica metà degli allevamenti come infetti e presenta un'incertezza estrema (IC 2-100%). Inoltre l'analisi di sensibilità del modello è evidenziato come la prevalenza di allevamenti infetti sia proprio il parametro nei confronti del quale il modello si è mostrato maggiormente sensibile. Per questo motivo i risultati sono stati riportati per tre diversi scenari di diffusione della scrapie che corrispondono a tre valori calcolati di  $R_0^{bf}$ : 1,08 dalla stima grezza di prevalenza (P=8%); 1,13 dal limite superiore dell'IC al 95% della stima grezza (P=12%); 1,94 dalla stima come MLE della prevalenza (P=48%).

Pur non essendo disponibile una stima pregressa di  $R_0^{bf}$  nel contesto italiano con cui confrontare questi dati, i valori ottenuti non si discostano da quelli riportati, seppur con modelli strutturalmente diversi, nel contesto inglese. Kao (2001) riporta un valore compreso tra 1,1 e 1,4. Truscott e Ferguson (2008a) calcolano invece il valore nazionale per razza - da 0,21 nella Suffolk (molto simile alla Sarda per composizione allelica) a 2,43 nella Shetland - e mostrano l'esistenza di differenze significative tra le diverse razze, dovute alla diversa struttura di allevamento.

In Italia, in condizioni naturali ovvero senza alcun intervento volto a selezionare i genotipi PrP, il modello ha indicato che la scrapie persiste, nelle popolazioni considerate, a livelli di diffusione pressoché identici a quelli iniziali, indipendentemente dalle condizioni iniziali di prevalenza.

L'applicazione delle norme minime richieste dallo schema selettivo del Reg. 999/2001/CE e recepito anche dal DM 17/12/2004, ovvero l'esclusione dalla riproduzione di arieti portatori dell'allele VRQ, non comporta l'eliminazione della malattia dalle popolazioni ovine per qualsiasi delle condizioni iniziali di diffusione della scrapie, esplorate dal modello.

Nel caso della razza Bergamasca il divieto di riprodurre arieti portatori dell'allele VRQ non solo non facilita il raggiungimento dell'eradicazione, ma comporta un incremento nel tempo, seppur minimo, del valore di  $R_0^{bf}$  ovvero una tendenza alla maggiore diffusione della scrapie. Al termine del periodo considerato dal modello, infatti, si raggiungono per le tre

condizioni iniziali di prevalenza dell'8%, 12% e 48% valori di  $R_0^{bf}$  rispettivamente di 1,13, 1,18 e 2,01.

Tutte le altre strategie testate risultano efficaci nell'eradicare la scrapie dalle tre popolazioni considerate, anche se con differenze talvolta anche elevate in termini di tempo e/o efficacia in funzione della prevalenza iniziale sul territorio e del grado di adesione degli allevamenti ai piani di selezione.

In condizioni di bassa prevalenza iniziale della malattia tra allevamenti (8%), non si rilevano sostanziali differenze di efficacia tra la strategia che prevede la selezione della popolazione ovina esclusivamente con arieti ARR/ARR (strategia *g*) che, per definizione, è considerata la più efficace e le strategie per le quali è previsto l'impiego di riproduttori con una maggiore variabilità di genotipi (*c*, *d*, *e* e *f*), a meno che non si realizzi una bassa compliance (25%).

Infatti al 25% di compliance nessuna tra le strategie testate ha mostrato la stessa efficacia della strategia di riferimento *g*. Con un livello del 50% di compliance si ottengono risultati diversi a seconda della popolazione analizzata. Nella Sarda-meticci risulta vantaggiosa quanto la *g* la strategia che seleziona con l'impiego di arieti nel cui genotipo vi sia almeno un ARR o siano ARQ<sub>res</sub>/ARQ<sub>res</sub> (*e*) mentre nella Bergamasca risulta efficace anche la selezione operata con arieti nel cui genotipo sia presente un solo allele resistente (ARR o ARQ<sub>res</sub>) (*d*, *f*). Aumentando il grado ipotizzato di adesione ai piani degli allevamenti, più strategie raggiungono la stessa efficacia di quella di riferimento. Al 75% di compliance le strategie *d*, *e* e *f* che permettono l'utilizzo in selezione di arieti nel cui genotipo sia presente almeno un allele considerato resistente, risultano efficaci quanto la strategia di riferimento in tutte e tre le popolazioni. Ciò suggerisce che possano essere utilizzate indifferentemente in selezione, con il vantaggio, rispetto alla strategia di riferimento, di poter disporre da subito di una proporzione di arieti con genotipo desiderato più elevata rispetto a quella disponibile con genotipo ARR/ARR.

Per la razza Bergamasca anche la strategia *c*, attuata oltre che con arieti che abbiano almeno un allele resistente anche con arieti privi sia di alleli resistenti che degli alleli VRQ e ARQ<sub>sus</sub>, risulta efficace quanto quella di riferimento nell'eradicare la malattia.

In condizione di prevalenza leggermente più alta (12%) è ancora evidente come impiegare in selezione arieti con una varietà di genotipi superiore rispetto alla strategia *g*, non sia affatto svantaggioso, sempre nell'intento di eradicare la malattia. Infatti nella

popolazione Sarda-meticci le strategie  $e$  e  $f$  sono ugualmente efficaci alla  $g$  con il 75% di compliance e a livelli superiori dell'80% (non mostrati nei risultati) lo è anche la  $d$ . Nella Sarda e nella Bergamasca sempre a livelli di compliance dell'80% la  $e$  e la  $f$  sono efficaci quanto la  $g$ . Comunque a livelli di compliance inferiori (25-50%) non si nota una forte differenza di efficacia tra le strategie esaminate, se non per la  $c$  che è comunque la strategia più permissiva in termini di scelta del genotipo degli arieti ammessi in selezione.

In condizioni di elevata prevalenza iniziale della scrapie tra allevamenti (48%) la scelta di una strategia selettiva rispetto ad un'altra è risultata secondaria al livello minimo di compliance necessario perché si realizzi un effetto di popolazione. Ipotizzando questa prevalenza la compliance richiesta per poter eradicare la scrapie dalla popolazione è risultata essere almeno del 50%. Inoltre la scelta della strategia di selezione è risultata obbligata poiché con il 50% di compliance solamente la strategia di riferimento si è dimostrata efficace e al 75% di compliance nessuna strategia alternativa è risultata efficace quanto quella di riferimento.

I risultati ottenuti dal nostro modello contrastano fortemente con quanto evidenziato da precedenti studi condotti in Gran Bretagna (Truscott and Freguson, 2008a-b; Woolhouse *et al.*, 2001) nei quali, in assenza di intervento selettivo, si riscontrava un andamento epidemico della scrapie nella popolazione. Tale andamento della malattia risultava caratterizzato da un periodo epidemico decisamente lungo al termine del quale si osservava l'estinzione della scrapie come un evento naturale che si verificava per effetto della progressiva perdita naturale degli alleli suscettibili dalla popolazione in un periodo di tempo complessivo di qualche centinaia di anni.

Nel nostro modello, il raggiungimento della condizione di eradicazione è stato valutato in un periodo di 50 anni ma si è verificata una stabilizzazione del valore di  $R_0^{bf}$  tale per cui considerando anche periodi più lunghi non si arriverebbe all'eliminazione della malattia e questa continuerebbe a persistere nella popolazione ovina.

La possibilità che la scrapie non sia una malattia endemica nella popolazione inglese ma si tratti di una lunga epidemia è stata specificatamente testata da Gubbins (2005). L'autore ha evidenziato come a partire dai dati di prevalenza della scrapie in Gran Bretagna sia possibile stimare (fittare) diversi valori del parametro di trasmissibilità della scrapie, alcuni dei quali compatibili con scenari di eradicazione naturale e altri con scenari di persistenza in forma endemica della malattia negli ovini.

L'inefficacia dell'applicazione delle norme minime richieste dalla CE per selezionare nella popolazione ovina i caratteri di resistenza alla scrapie è nettamente in contrasto con quanto evidenziato da Gubbins e Roden (2005) in Gran Bretagna che indicavano in circa 20 anni il tempo necessario perché questa strategia, a seguito della sensibile riduzione di prevalenza e incidenza della scrapie, ne comporti l'eliminazione dalla popolazione. Gli stessi autori concludevano che qualsiasi altra strategia che implementasse una selezione più restrittiva, non solo contro il VRQ ma verso altri alleli, non avrebbe comportato ulteriori vantaggi, essendo l'efficacia selettiva essenzialmente legata alle azioni prese contro il VRQ, in quanto allele a maggiore suscettibilità.

Sempre nella popolazione inglese, Truscott e Ferguson, (2005) prevedevano sotto l'ipotesi di selezione contro l'allele VRQ, un tempo di eradicazione superiore (circa 50 anni), in conseguenza della struttura eterogenea del modello. Gli autori osservavano come, applicando il requisito selettivo minimo richiesto dalla UE, aumentasse tra l'altro la frequenza dell'allele ARQ nella popolazione. Quest'ultima condizione si è verificata anche nel nostro modello per la razza Bergamasca nella quale l'eliminazione dell'allele VRQ dai genotipi in selezione ha favorito l'incremento di frequenza dell' ARQ<sub>sus</sub> determinando, all'opposto di quanto osservato da Truscott e Ferguson, in conseguenza di ciò il progressivo aumento nel tempo di  $R_0^{bf}$ .

Questi risultati contrastanti nascono verosimilmente, più che dall'implementazione di modelli strutturalmente diversi, da reali differenze epidemiologiche che si traducono in termini di rischio e suscettibilità genotipo dipendente nel modello.

Altra strategia selettiva per la quale è possibile un confronto rispetto all'efficacia mostrata in questo e in altri studi presenti in letteratura, è la strategia che seleziona con arieti nel cui genotipo sia presente almeno un allele ARR ( $f$ ). Essa in Gubbins e Webb (2005) permetteva di eradicare la malattia in tempi diversi (da 30 a 100 anni) in base alle condizioni iniziali di stima del parametro di trasmissibilità e di probabilità di notifica di un caso di malattia, tali per cui, in condizioni di elevata trasmissibilità, la strategia  $f$  non permetteva di eradicare la scrapie. I nostri risultati concordano con quelli di Gubbins e Webb ad alti livelli di prevalenza per i quali la strategia  $f$  non è stata in grado di eradicare la malattia.

Non è possibile confrontare l'efficacia delle altre strategie testate ( $c$ ,  $d$  e  $e$ ), con i lavori presenti nella letteratura scientifica, poiché queste sono appositamente costruite in funzione del piano di selezione previsto in ambito nazionale (D.M. 17/12/2004).

Da un punto di vista metodologico, gli scenari di diffusione della scrapie tra animali come anche tra allevamenti sono risultati regolati da meccanismi estremamente complessi che è



stato indispensabile semplificare per poterli riprodurre in termini matematici. In questo processo di semplificazione sono state operate scelte importanti essenzialmente sugli aspetti strutturali e sulle assunzioni del modello.

In particolare è stata data massima importanza alla trasmissione diretta della malattia per via orizzontale che sembra giustificare la maggioranza delle infezioni (Ryder *et al.*, 2004), mentre non sono state considerate le vie di trasmissione verticale, la cui rimozione non sembra, secondo dati di letteratura, avere un effetto significativo nel controllo della malattia (Woolhouse *et al.*, 1999). Anche la fonte di infezione ambientale non è stata considerata nel modello in quanto non sembra avere un'importanza decisiva nella diffusione laddove siano già presenti in allevamento individui infetti che determinano una trasmissione orizzontale.

Un ultimo aspetto strutturale considerato per la realizzazione del modello è stata l'assunzione dell'omogeneità nella struttura e nei contatti tra i diversi allevamenti.

Queste scelte possono aver introdotto distorsioni nei risultati per quanto riguarda i tempi di eradicazione. Si deve quindi tenere presente che i tempi calcolati dal modello siano sottostimati rispetto alle condizioni reali. In ogni caso il modello fornisce un'indicazione sull'efficacia delle strategie analizzate nell'eradicazione della scrapie, indipendentemente dal tempo impiegato. Inoltre l'obiettivo del lavoro era l'individuazione di quali tra le strategie analizzate fossero più efficaci nell'ottenere l'eradicazione, risultato che si è potuto ottenere facilmente nel confronto delle tempistiche relative espresse dal modello.

Il nostro modello dimostra come l'andamento della Scrapie in assenza d'interventi in Italia sia endemico. In tale contesto la condizione minima efficace in tutti gli scenari testati per avere un effetto di popolazione ovvero per realizzare condizioni sfavorevoli alla diffusione della scrapie in una popolazione, in termini di selezione genetica, è l'esclusione di arieti con l'allele ARQ<sub>sus</sub> dalla riproduzione. L'allele ARQ<sub>sus</sub> è dimostrato essere il target genotipico preferito dal ceppo di scrapie classica circolante in Italia (Di Bari *et al.*, 2008; Nonno *et al.*, 2003; Agrimi, dati non pubblicati). Una evidenza importante è che non sia necessario eliminare completamente tale allele dalla popolazione per arrivare all'eradicazione della malattia, come tra l'altro riscontrato anche in Gran Bretagna (Truscott e Ferguson 2008a) rispetto alla selezione negativa per l'allele VRQ.

La strategia che seleziona la popolazione ovina solo con arieti ARR/ARR si è dimostrata complessivamente la più efficace, in termini di tempo, nell'eradicare la malattia dalle tre popolazioni considerate ma anche le strategie che operano la selezione utilizzando arieti con

almeno un allele resistente quale l'ARR o l'ARQ<sub>res</sub> (*d, e, f*) sono risultate, in relazione alle condizioni di prevalenza iniziale tra allevamenti e di compliance, ugualmente efficaci. Tali strategie selettive, alternative a quella identificata a livello europeo e nazionale come la strategia di preferenza, presentano il vantaggio di mantenere nella popolazione una più ampia variabilità genotipica. Ciò è importante soprattutto alla luce della esistenza di ceppi diversi di scrapie circolanti in Europa e dell'identificazione della forma atipica di scrapie (Nor98) che presenta un target genotipico diverso. Sembra infatti che gli ovini ARR/ARR abbiano un'elevata suscettibilità alla scrapie atipica mentre i genotipi contenenti l'ARQ<sub>sus</sub> siano meno a rischio. Alla luce di ciò una ampia variabilità genotipica della popolazione rappresenta una buona difesa da eventuali ceppi, già circolanti o di nuova emersione, che potrebbero diffondersi nel futuro.

Il nostro studio mostra chiaramente come per poter fare previsioni a lungo termine sulla migliore strategia di controllo, occorra stimare accuratamente la reale prevalenza della scrapie classica sul territorio. Infatti un punto critico dei lavori di modellistica sulla diffusione della scrapie è risultato essere la relazione tra l'incidenza dei casi e la reale prevalenza della malattia nella popolazione (Gubbins *et al.*, 2011). Risulta estremamente importante in tal senso investire per migliorare e incoraggiare la notifica dei casi (Kao *et al.*, 2001, Gubbins e Roden 2005). Conoscendo la prevalenza è infatti possibile quantificare lo sforzo necessario, in termini di adesione minima ai piani di selezione genetica da parte degli allevatori, affinché il piano risulti efficace.

Il livello di adesione degli allevatori ai piani di selezione rappresenta un elemento cruciale per la riuscita di tale intervento selettivo, in grado di influenzare la scelta stessa delle strategie selettive ovvero dei montoni da adibire alla riproduzione. Tale componente si configura come l'elemento sul quale è maggiore il margine di azione da parte delle autorità sanitarie che possono dunque modulare nel tempo l'efficacia dei piani, ovvero stabilire la velocità da imprimere ai piani di selezione genetica, attraverso l'identificazione di strumenti di incentivazione in grado di favorire l'adesione degli allevatori.

Infine, il modello si è dimostrato un utile strumento non solo in termini predittivi, sulla base di diverse ipotesi di diffusione iniziale della malattia nella popolazione, ma anche per identificare quali siano le informazioni che necessitano di una migliore stima e quelle più utili da raccogliere con le attività di sorveglianza, al fine di informare le scelte e le attività di controllo della scrapie.

## **VI - Appendice**

sentano le frequenze alleliche negli arieti impostate all'inizio della riproduzione

[– frequenza dell'allele ARH; fALRR– frequenza dell'allele ARR;

le ARQK<sub>176</sub>.

	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	fAFRQ	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	fAFRQ	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	0
	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	fAFRQ
	0	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0
	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0
	fAFRQ/2	fAFRQ/2	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0
	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0	0	0	0	0	fAFRQ/2	0
	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	fVLRQ	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	0	0
	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	fVLRQ/2	0
/2	fARQK176/2	fARQK176/2	fARQK176/2	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	fVLRQ
AL	fALRQ/2	fALRQ/2	fALRQ/2	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0
	0.5* (fVLRQ+fALRR)	fALRR/2	fALRR/2	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0
/2	fT112ARQ/2	0.5* (fVLRQ+fT112ARQ)	fT112ARQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0
/2	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	0.5* (fVLRQ+fAT137RQ)	0	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0	0	0	0	0	fVLRQ/2	0
	0	0	0	fALHQ	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	fALRH	0.5* (fALHQ+fALRH)	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	fALHQ	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	fALHQ/2	0
	0	0	0	fARQK176	fARQK176/2	0.5* (fALHQ+fARQK176)	fARQK176/2	fARQK176/2	fARQK176/2	fARQK176/2	0	fALHQ/2	0	0	0	0	fALHQ
	0	0	0	fALRQ	fALRQ/2	fALRQ/2	0.5* (fALHQ+fALRQ)	fALRQ/2	fALRQ/2	fALRQ/2	0	0	fALHQ/2	0	0	0	0
	fALHQ/2	0	0	fALRR	fALRR/2	fALRR/2	fALRR/2	0.5* (fALHQ+fALRR)	fALRR/2	fALRR/2	0	0	0	fALHQ/2	0	0	0
	0	fALHQ/2	0	fT112ARQ	fT112ARQ/2	fT112ARQ/2	fT112ARQ/2	fT112ARQ/2	0.5* (fALHQ+fT112ARQ)	fT112ARQ/2	0	0	0	0	fALHQ/2	0	0
	0	0	fALHQ/2	fAT137RQ	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	0.5* (fALHQ+fAT137RQ)	fAT137RQ/2	0	0	0	0	0	fALHQ/2	0
	0	0	0	0	fALRH/2	0	0	0	0	0	fALRH	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	fALRH/2	0
	0	0	0	0	fARQK176/2	fALRH/2	0	0	0	0	fARQK176	0.5* (fALRH+fARQK176)	fARQK176/2	fARQK176/2	fARQK176/2	fARQK176/2	fALRH
	0	0	0	0	fALRQ/2	0	fALRH/2	0	0	0	fALRQ	fALRQ/2	0.5* (fALRH+fALRQ)	fALRQ/2	fALRQ/2	fALRQ/2	0
	fALRH/2	0	0	0	fALRR/2	0	0	fALRH/2	0	0	fALRR	fALRR/2	fALRR/2	0.5* (fALRH+fALRR)	fALRR/2	fALRR/2	0
	0	fALRH/2	0	0	fT112ARQ/2	0	0	0	fALRH/2	0	fT112ARQ	fT112ARQ/2	fT112ARQ/2	fT112ARQ/2	0.5* (fALRH+fT112ARQ)	fT112ARQ/2	0
	0	0	fALRH/2	0	fAT137RQ/2	0	0	0	0	fALRH/2	fAT137RQ	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	fAT137RQ/2	0.5* (fALRH+fAT137RQ)	0
	0	0	0	0	0	fARQK176/2	0	0	0	0	0	fARQK176/2	0	0	0	0	fARQK176
/2	0	0	0	0	0	fALRQ/2	fARQK176/2	0	0	0	0	fALRQ/2	fARQK176/2	0	0	0	fALRQ
	fARQK176/2	0	0	0	0	fALRR/2	0	fARQK176/2	0	0	0	fALRR/2	0	fARQK176/2	0	0	fALRR
	0	fARQK176/2	0	0	0	fT112ARQ/2	0	0	fARQK176/2	0	0	fT112ARQ/2	0	0	fARQK176/2	0	fT112ARQ
	0	0	fARQK176/2	0	0	fAT137RQ/2	0	0	0	fARQK176/2	0	fAT137RQ/2	0	0	0	fARQK176/2	fAT137RQ

**Tabella 3.2.2** – Frequenze iniziali dei genotipi PrP nelle popolazioni Sarda e Sarda-meticci incluse nel modello genotipico di popolazione.

<b>Genotipo</b>	<b>Sarda</b>		<b>Sarda-meticci</b>	
	<i>N</i>	<i>f (%)</i>	<i>N</i>	<i>f (%)</i>
AF <sub>141</sub> RQ/AF <sub>141</sub> RQ	4	0,64	5	0,60
AF <sub>141</sub> RQ/AHQ	2	0,32	2	0,24
AF <sub>141</sub> RQ/ARH	-	-	1	0,12
AF <sub>141</sub> RQ/ARQK <sub>176</sub>	4	0,64	4	0,48
AF <sub>141</sub> RQ/ARQ	25	3,99	30	3,61
AF <sub>141</sub> RQ/ARR	20	3,19	25	3,01
AF141RQ/VRQ	-	-	-	-
AF <sub>141</sub> RQ/T <sub>112</sub> ARQ	2	0,32	3	0,36
AF <sub>141</sub> RQ/AT <sub>137</sub> RQ	1	0,16	1	0,12
VRQ/VRQ	-	-	1	0,12
VRQ/AHQ	-	-	-	-
VRQ/ARH	-	-	1	0,12
VRQ/ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-
VRQ/ARQ	-	-	3	0,36
VRQ/ARR	2	0,32	9	1,08
VRQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-
VRQ/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-
AHQ/AHQ	1	0,16	1	0,12
AHQ/ARH	-	-	1	0,12
AHQ/ARQK <sub>176</sub>	3	0,48	3	0,36
AHQ/ARQ	25	3,99	38	4,57
AHQ/ARR	21	3,35	25	3,01
AHQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-
AHQ/AT <sub>137</sub> RQ	4	0,64	4	0,48
ARH/ARH	-	-	1	0,12
ARH/ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-
ARH/ARQ	2	0,32	8	0,96
ARH/ARR	-	-	5	0,60
ARH/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-
ARH/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /ARQ	16	2,55	18	2,17
ALRQK <sub>176</sub> /ARR	27	4,31	30	3,61
ARQK <sub>176</sub> /T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /AT <sub>137</sub> RQ	1	0,16	1	0,12
ARQ/ARQ	126	20,10	169	20,34
ARQ/ARR	230	36,68	292	35,14
ARQ/T <sub>112</sub> ARQ	3	0,48	7	0,84
ARQ/A <sub>137</sub> RQ	10	1,59	10	1,20
ARR/ARR	82	13,08	113	13,60
ARR/T <sub>112</sub> ARQ	1	0,16	4	0,48
ARR/AT <sub>137</sub> RQ	14	2,23	14	1,68
T <sub>112</sub> ARQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	1	0,12
T <sub>112</sub> ARQ/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	0,00
AT <sub>137</sub> RQ/AT <sub>137</sub> RQ	1	0,16	1	0,12
<b>totale</b>		100		100

**Tabella 3.2.3** – Frequenze iniziali dei genotipi PrP nella popolazione di razza Bergamasca incluse nel modello genotipico di popolazione.

<b>Genotipo</b>	<b>Bergamasca</b>	
	<i>N</i>	<i>f (%)</i>
AF141RQ/AF141RQ	-	-
AF141RQ/ARK	2	4,08
AF141RQ/ARH	-	-
AF141RQ/ARQK176	-	-
AF141RQ/ARQ	5	10,20
AF141RQ/ARR	-	-
AF141RQ/VRQ	1	2,04
AF141RQ/T112ARQ	-	-
AF141RQ/AT137RQ	-	-
VRQ/VRQ	1	2,04
VRQ/ARK	-	-
VRQ/ARH	1	2,04
VRQ/ARQK176	-	-
VRQ/ARQ	2	4,08
VRQ/ARR	-	-
VRQ/T112ARQ	-	-
VRQ/AT137RQ	-	-
ARK/ARK	-	-
AHQ/ARH	-	-
AHQ/ARQK176	-	-
AHQ/ARQ	5	10,20
AHQ/ARR	2	4,08
AHQ/T112ARQ	-	-
AHQ/AT137RQ	-	-
ARH/ARH	-	-
ARH/ARQK176	-	-
ARH/ARQ	2	4,08
ARH/ARR	-	-
ARH/T112ARQ	-	-
ARH/AT137RQ	-	-
ARQK176/ARK176	-	-
ARQK176/ARQ	-	-
ALRQK176/ARR	-	-
ARQK176/T112ARQ	-	-
ARQK176/AT137RQ	-	-
ARQ/ARQ	17	34,69
ARQ/ARR	6	12,24
ARQ/T112ARQ	3	6,12
ARQ/AT137RQ	-	-
ARR/ARR	2	4,08
ARR/T112ARQ	-	-
ARR/AT137RQ	-	-
T112ARQ/T112ARQ	-	-
T112ARQ/AT137RQ	-	-
AT137RQ/AT137RQ	-	-
totale	49	100

**Tabella 3.2.6** - Frequenze genotipiche degli arieti in riproduzione che alimentano il modello per la popolazione Sarda per ciascuna delle sette strategie riproduttive testate nel modello.

<b>Genotipo</b>	<b>Strategia riproduttiva</b>						
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>
AF <sub>141</sub> RQ/AF <sub>141</sub> RQ	0,64	0,64	-	-	-	0,80	-
AF <sub>141</sub> RQ/AHQ	0,32	0,32	-	-	-	0,40	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARH	-	-	-	-	-	-	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARQK <sub>176</sub>	0,64	0,64	-	-	0,92	0,80	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARQ	3,99	4,00	-	-	-	5,01	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARR	3,19	3,20	5,06	5,04	4,60	4,01	-
AF <sub>141</sub> RQ/VRQ	-	-	-	-	-	-	-
AF <sub>141</sub> RQ/T <sub>112</sub> ARQ	0,32	0,32	-	-	-	0,40	-
AF <sub>141</sub> RQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,16	0,16	-	-	0,23	0,20	-
VRQ/VRQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/AHQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARH	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARR	0,32	-	-	-	-	-	-
VRQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/AHQ	0,16	0,16	-	-	-	0,20	-
AHQ/ARH	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/ARQK <sub>176</sub>	0,48	0,48	-	-	0,69	0,60	-
AHQ/ARQ	3,99	4,00	-	-	-	5,01	-
AHQ/ARR	3,35	3,36	5,32	5,29	4,83	4,21	-
AHQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,64	0,64	-	-	0,92	0,80	-
ARH/ARH	-	-	-	-	-	-	-
ARH/ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-	-	-	-
ARH/ARQ	0,32	0,32	-	-	-	0,40	-
ARH/ARR	-	-	-	-	-	-	-
ARH/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARH/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /ARK <sub>176</sub>	-	-	-	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /ARQ	2,55	2,56	-	-	3,68	3,21	-
ALRQK <sub>176</sub> /ARR	4,31	4,32	6,84	6,80	6,21	5,41	-
ARQK <sub>176</sub> /T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /AT <sub>137</sub> RQ	0,16	0,16	0,00	0,25	0,23	0,20	-
ARQ/ARQ	20,10	20,16	-	-	-	-	-
ARQ/ARR	36,68	36,80	58,23	57,93	52,87	46,09	-
ARQ/T <sub>112</sub> ARQ	0,48	0,48	-	-	-	0,60	-
ARQ/A <sub>137</sub> RQ	1,59	1,60	-	-	2,30	2,00	-
ARR/ARR	13,08	13,12	20,76	20,65	18,85	16,43	100
ARR/T <sub>112</sub> ARQ	0,16	0,16	0,25	0,25	0,23	0,20	-
ARR/AT <sub>137</sub> RQ	2,23	2,24	3,54	3,53	3,22	2,81	-
T <sub>112</sub> ARQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
T <sub>112</sub> ARQ/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-	-	-	-
AT <sub>137</sub> RQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,16	0,16	0,00	0,25	0,23	0,20	-
<b>totale</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

**Tabella 3.2.7-** Frequenze genotipiche degli arieti in riproduzione che alimentano il modello per la popolazione Sarda-meticei per ciascuna delle sette strategie riproduttive testate nel modello.

<b>Genotipo</b>	<b>Strategia riproduttiva</b>						
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>
AF <sub>141</sub> RQ/AF <sub>141</sub> RQ	0,60	0,61	-	-	-	0,77	-
AF <sub>141</sub> RQ/AHQ	0,24	0,24	-	-	-	0,31	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARH	0,12	0,12	-	-	-	0,15	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARQK <sub>176</sub>	0,48	0,49	-	-	0,73	0,62	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARQ	3,61	3,67	-	-	-	4,63	-
AF <sub>141</sub> RQ/ARR	3,01	3,06	4,92	4,90	4,55	3,86	-
AF <sub>141</sub> RQ/VRQ	-	-	-	-	-	-	-
AF <sub>141</sub> RQ/T <sub>112</sub> ARQ	0,36	0,37	-	-	-	0,46	-
AF <sub>141</sub> RQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,12	0,12	-	-	0,18	0,15	-
VRQ/VRQ	0,12	-	-	-	-	-	-
VRQ/AHQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARH	0,12	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARQ	0,36	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARR	1,08	-	-	-	-	-	-
VRQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/AHQ	0,12	0,12	-	-	-	0,15	-
AHQ/ARH	0,12	0,12	-	-	-	0,15	-
AHQ/ARQK <sub>176</sub>	0,36	0,37	-	-	0,55	0,46	-
AHQ/ARQ	4,57	4,65	-	-	-	5,86	-
AHQ/ARR	3,01	3,06	4,92	4,90	4,55	3,86	-
AHQ/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,48	0,49	-	-	0,73	0,62	-
ARH/ARH	0,12	0,12	-	-	-	0,15	-
ARH/ARQK <sub>176</sub>	-	-	-	-	-	-	-
ARH/ARQ	0,96	0,98	-	-	-	1,23	-
ARH/ARR	0,60	0,61	0,98	0,98	0,91	0,77	-
ARH/T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARH/AT <sub>137</sub> RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /ARK <sub>176</sub>	-	-	-	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /ARQ	2,17	2,20	-	-	3,27	2,78	-
ALRQK <sub>176</sub> /ARR	3,61	3,67	5,91	5,88	5,45	4,63	-
ARQK <sub>176</sub> /T <sub>112</sub> ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQK <sub>176</sub> /AT <sub>137</sub> RQ	0,12	0,12	0,00	0,20	0,18	0,15	-
ARQ/ARQ	20,34	20,69	-	-	-	-	-
ARQ/ARR	35,14	35,74	57,48	57,25	53,09	45,06	-
ARQ/T <sub>112</sub> ARQ	0,84	0,86	-	-	-	1,08	-
ARQ/A <sub>137</sub> RQ	1,20	1,22	-	-	1,82	1,54	-
ARR/ARR	13,60	13,83	22,24	22,16	20,55	17,44	100
ARR/T <sub>112</sub> ARQ	0,48	0,49	0,79	0,78	0,73	0,62	-
ARR/AT <sub>137</sub> RQ	1,68	1,71	2,76	2,75	2,55	2,16	-
T <sub>112</sub> ARQ/T <sub>112</sub> ARQ	0,12	0,12	0,00	0,00	0,00	0,15	-
T <sub>112</sub> ARQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
AT <sub>137</sub> RQ/AT <sub>137</sub> RQ	0,12	0,12	0,00	0,20	0,18	0,15	-
<b>totale</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>



**Tabella 3.2.8** - Frequenze genotipiche degli arieti in riproduzione che alimentano il modello per la popolazione Bergamasca per ciascuna delle sette strategie riproduttive testate nel modello.

<b>Genotipo</b>	<b>Strategia riproduttiva</b>						
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>
AF141RQ/AF141RQ	-	-	-	-	-	-	-
AF141RQ/ARK	4,08	4,55	-	-	-	7,41	-
AF141RQ/ARH	-	-	-	-	-	-	-
AF141RQ/ARQK176	-	-	-	-	-	-	-
AF141RQ/ARQ	10,20	11,36	-	-	-	18,52	0
AF141RQ/ARR	-	-	-	-	-	-	-
AF141RQ/VRQ	2,04	-	-	-	-	-	-
AF141RQ/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
AF141RQ/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/VRQ	2,04	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARK	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARH	2,04	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARQK176	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARQ	4,08	-	-	-	-	-	-
VRQ/ARR	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
VRQ/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARK/ARK	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/ARH	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/ARQK176	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/ARQ	10,20	11,36	-	-	-	18,52	-
AHQ/ARR	4,08	4,55	20	20	20	7,41	-
AHQ/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
AHQ/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARH/ARH	-	-	-	-	-	-	-
ARH/ARQK176	-	-	-	-	-	-	-
ARH/ARQ	4,08	4,55	-	-	-	7,41	-
ARH/ARR	-	-	-	-	-	-	-
ARH/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARH/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQK176/ARK176	-	-	-	-	-	-	-
ARQK176/ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ALRQK176/ARR	-	-	-	-	-	-	-
ARQK176/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQK176/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARQ/ARQ	34,69	38,64	-	-	-	-	-
ARQ/ARR	12,24	13,64	60	60	60	22,22	-
ARQ/T112ARQ	6,12	6,82	-	-	-	11,11	-
ARQ/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
ARR/ARR	4,08	4,55	20	20	20	7,41	100,00
ARR/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
ARR/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
T112ARQ/T112ARQ	-	-	-	-	-	-	-
T112ARQ/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
AT137RQ/AT137RQ	-	-	-	-	-	-	-
<i>totale</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

## VII - Bibliografia

Acin C., I. Martin-Burriel, W. Goldmann, J. M. Lyahyai, Monzon, R. Bolea, et al. – 2004. *Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep*. J. Gen. Virol. 85: 2103–2110.

Aguzzi A. and M. Polymenidou – 2004. *Mammalian prion biology: one century of evolving concepts*. Cell 116: 313-327.

AIA - Bollettino dei controlli della produttività del latte negli ovini” - Associazione Italiana Allevatori: <http://www.aia.it/bollettino/bollettino.htm>

Alvarez L., J.J. Arranz, F. San Primitivo – 2006. *Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine protein gene in Spanish sheep*. J. Anim. Sci. 84: 259–265.

Anderson R.M., May R.M. – 1992. *Infectious diseases of humans: dynamics and control*. Oxford, New York: Oxford University Press.

Andréoletti O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. van Keulen, F. Schelder, J.M. Elsen and F. Lantier – 2000. *Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural Scrapie*. J. Gen. Virol. 81: 3115-3126.

Andréoletti O., C. Lacroux, A. L. Chabert, Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J.M. Elsen, F. Schelcher – 2002. *PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission*. J. Gen. Virol. 83(Pt 10): 2607-2616.

Baylis M, W. Goldmann, F. Houston, D. Cairns, A. Chong, A. Ross, A. Smith, N. Hunter, A.R. McLean – 2002. *Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock*. J. Gen. Virol. Nov;83(Pt 11): 2907-2914.

Baylis M., C. Chihota, E. Stevenson, W. Goldmann, A. Smith, K. Sivam, S. Tongue and M. B. Gravenor – 2004. *Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype*. J. Gen. Virol. 85: 2735–2740

Baylis M, W. Goldmann – 2004. *The genetics of scrapie in sheep and goats*. Curr Mol Med. Jun; 4(4): 385-396.

Belt P.B., I.H. Muileman, B.E. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A.L. Gielkens, M.A. Smits - 1995. *Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie*. J. Gen. Virol. Mar; 76 ( Pt 3): 509-517.

Benestad S.L., J.N. Arsaç, W. Goldmann, N`oremark – 2008. *Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology*. Vet. Res. 39:19

Benestad S.L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M.A. Tranulis, B. Bratberg – 2003. *Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98*. Vet. Rec. 153: 202-208.

- Billinis C., V. Psychas, L. Leontides, V. Spyrou, S. Argyroudis, I. Vlemmas, et al. – 2004. *Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece*. J. Gen. Virol. 85: 547–554.
- Bolton D.C., M.P. McKinley, S.B. Prusiner – 1982. *Identification of a protein that purifies with the scrapie prion*. Science 218: 1309-1311.
- Brown D.R. - 1999(a). *Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper*. J. Neurosci. Res. 58: 717-725.
- Brown D.R. - 1999(b). *Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase*. Biochem. Journal 344: 1-5.
- Bruce ME, I. McConnell, H. Fraser, A.G. Dickinson – 1991. *The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis*. J. Gen. Virol. Mar72 (3): 595-603.
- Bruce M.E., R.G. Will, J.W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, C.J. Bostock – 1997. *Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent*. Nature 389: 498-501.
- Büeler H, A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, C. Weissmann - 1993. *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie*. Cell; 73: 1339–47
- Casalone C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco, M. Caramelli – 2004. *Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 3065-3070.
- CE- Report, Health And Consumers Directorate-General - 2007. *Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of TSE in the EU*.
- CE- REGOLAMENTO (CE) N. 999/2001 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 maggio 2001 recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili (GU L 147 del 31.5.2001, pag. 1)
- CE- DIRETTIVA 2003/100/CE DELLA COMMISSIONE del 31 ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali
- CE- REGOLAMENTO (CE) N. 727/2007 DELLA COMMISSIONE del 26 giugno 2007 che modifica gli allegati I, III, VII e X del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili
- Collinge J., M.A. Whittington, K.C.L. Sidle, C.J. Smith, M.S. Palmer, A.R. Clarke and J.G.R. Jeffreys – 1994. *Prion protein is necessary for normal synaptic function*. Nature 370: 295-297

Corbière F., F. Barillet, O. Andréoletti, F. Fidelle, N. Laphitz-Bordet, F. Schelcher, P. Joly. *Advanced survival models for risk-factor analysis in scrapie*. J Gen Virol. 2007 Feb;88(Pt 2):696-705.

Cosseddu G.M., U. Agrimi, J. Pinto and A.A. Schudel – 2007. *Advances in scrapie research*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 26(3): 657-668.

Cravero G. , F. Guarda, U. Dotta, R. Guglielmino - 1977. *La scrapie in pecore di razza biellese. Prima segnalazione in Italia*. La Clinica Veterinaria 100: 1–14.

Daude N. – 2004. *Prion diseases and the spleen*. Viral Immunol. 17(3): 334-49.

DECRETO 17 dicembre 2004. Piano nazionale di selezione genetica per la resistenza alle encefalopatie spongiformi negli ovini.

De Jong M.C.M., O. Diekmann, J.A.P. Heesterbek -1995. *How does transmission of infection depend on population size?. In: Epidemic Models: their structure and relation to data*. Mollison D. Ed., Cambridge University Press, Cambridge.

Detwiler L.A., M.Baylis – 2003. *The epidemiology of scrapie*. Rev. Sci. Tech. 22: 121-143.

Diaz C., Z.G. Vitezica, R. Rupp, O. Andreoletti, J.M. Elsen – 2005. *Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock*. J. Gen. Virol. 86: 849-857.

Di Bari M.A., F. Chianini, G. Vaccari, E. Esposito, M. Conte, S.L. Eaton, S. Hamilton, J. Finlayson, P.J. Steele, M.P. Dagleish, H.W. Reid, M. Bruce, M. Jeffrey, U. Agrimi, R. Nonno - 2008. *The bank vole (Myodes glareolus) as a sensitive bioassay for sheep scrapie*. Journal of General Virology Dec;89(Pt 12):2975-85

Dieckman O., J.A.P. Heesterbeek - 2000. *Mathematical Epidemiology of Infectious Diseases: Model Building, Analysis and Interpretation*. Hoboken, N.J.: Wiley.

Di Guardo G., P.S. Marcato – 2002. *Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili*. In: Marcato P.S. *Patologia Sistemica Veterinaria*. Bologna, Edagricole Il Sole 24 Ore: 1302-1311.

Diringer H., R.H. Kimberlin - 1983. *Infectious scrapie agent is apparently not as small as recent claims suggest*. Biosci. Rep. 3: 563-568.

Dowson M., C.M. Moore, S.C. Bishop - 2008. *Progress and limit of PrP gene selection policy*. Vet. Re. 39:25

EFSA – 2011. *Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Joint Scientific opinion on any possible epidemiological or molecular association between TSEs in animals and humans*. EFSA Journal 9(1): 1945.

Eloit M., K. Adjou, M. Couplier, J.J Fontaine, R. Hamel, T. Lilin, S. Messiaen, O. Andreoletti, T. Baron, A. Bencsik, A.G. Biacabe, V. Beringue, H. Laude, A. Le Dur, J.L. Vilotte, E. Comoy, J.P. Deslys, J. Grassi, S. Simon, F. Lantier, P. Sarradin. *BSE agent signatures in a goat*. Vet Rec. 2005 Apr 16;156(16):523-4.

- Elsen J.M., Y. Aigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J.V. Ttien Khang, J.P. Poivey, F. Lantier, J.L. Laplanche – 1999. *Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie. Detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov*. Arch. Virol. 144: 431-445.
- Fediaevsky A., C. Maurella, M. Nöremark, F. Ingravalle, S. Thorgeirsdottir, L. Orge, R. Poizat, M. Hautaniemi, B. Liam, D. Calavas, G. Ru, P. Hopp - 2010. *The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries*. BMC Vet Res. 2010 Feb 7;6:9.
- Foster J.D., J. Hope, and H. Fraser - 1993. *Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats*. Vet. Rec. 133: 339–341.
- Foster J.D., D. Parnham, A. Chong, W. Goldmann, N. Hunter – 2001. *Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats*. Vet. Rec. 148: 165–171.
- Fraser H, Dickinson AG. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. J Comp Pathol. 1973 Jan;83(1):29-40.
- Goldmann W., N. Hunter, J.D. Foster, J.M. Salbaum, K. Beyreuther, J. Hope - 1990. *Two alleles of neuronal protein gene linked to scrapie in sheep*. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2476-2480.
- Goldmann W., N. Hunter, G. Benson, J.D. Foster, J. Hope – 1991. *Different scrapie associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene*. J. Gen. Virol. 72: 2411-2417.
- Goldmann W, N. Hunter, G. Smith, J. Foster, J. Hope – 1994. *PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie*. J. Gen. Virol. 75: 989-995.
- González L., M.P. S.J. Dagleish, Bellworthy, S. Sisò, M.J. Stack, L.A. Chaplin, S.A.C. Hawkins, J. Hughes, M. Jeffrey – 2006. *Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa*. Vet. Rec. 158: 325-331.
- Gravenor M.B., P. Papasozomenos, A.R. McLean, G. Neophytu – 2004. *A scrapie epidemic in Cyprus*. Epidemiol. Infect. 132:751–760.
- Gubbins S. – 2005. *A modelling framework to describe the spread of scrapie between sheep flocks in Great Britain*. Prev. Vet. Med. 67:143–156.
- Gubbins S. and C.R. Webb – 2005. *Simulation of the options for a national control programme to eradicate scrapie from Great Britain*. Prev. Vet. Med. 69: 175–187.
- Gubbins S. and J.A. Roden – 2006. *Breeding programmes for TSE resistance in British sheep. II. Assessing the impact on the prevalence and incidence of scrapie*. Prev. Vet. Med. 73: 17–31.

- Guillaume T., C. Lacroux, S. Lugan, P. Costes, F. Corbière, J.L. Weisbecker, F. Schelcher and O. Andreoletti – 2010. *Relevancy of oral experimental challenge with classical scrapie in sheep*. JGV Papers in Press.
- Hagenaars T.J., C.A. Donnelly, N.M. Ferguson, R.M. Anderson – 2000. *The transmission dynamics of the aethiological agent of scrapie in a sheep flock*. Math. Biosci. 168: 117-135.
- Hagenaars T.J., N.M. Ferguson, C.A. Donnelly, R.M. Anderson – 2001. *Persistence patterns of scrapie in a sheep flock*. Epidemiol. Infect. 127: 157–167.
- Hagenaars T.J., C.A. Donnelly, N.M. Ferguson, R.M. Anderson – 2003. *Dynamics of a scrapie outbreak in a flock of Romanov sheep – estimation of transmission parameters*, Epidemiol. Infect. 131: 1015–1022.
- Hagenaars T.J., C.A. Donnelly, N.M. Ferguson – 2006. *Epidemiological analysis of data for scrapie in Great Britain*. Epidemiol. Infect. 134: 359–367.
- Hagenaars T.J., M.B. Melchior, A. Bossers, A. Davidse, B. Engel, F.G. van Zijderveld - 2010. *Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance*. BMC Vet. Res. May 14(6): 25.
- Hermes J., T. Tngs, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schurmann, O. Windl, N. Brose, H. Kretzschmar - 1999. *Evidence of presynaptic location and function of the prion protein*. The Journal of Neuroscience 19(20): 8866-8875.
- Hethcote H.W., D. P. van Den - 1995. *An SIS epidemic model with variable population size and a delay*. J. Math.Biol. 34(2): 177-194.
- Hetz C., K. Maundrell, C. Soto - 2003. *Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders?*. Trends in Molecular Medicine 6,9: 237-243.
- Hill A.F., M. Desbruslais, S. Joiner, K.C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L.J. Doey, P. Lantos - 1997. *The same prion strain causes vCJD and BSE*. Nature 389: 448-450.
- Horiuchi M., B. Caughey, 1999. *Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies*. Structure Fold. Des. 7: 231-40.
- Houston E.F., S. Halliday, M. Jeffrey, W. Goldmann, N. Hunter – 2002. *New Zealand sheep with scrapie-susceptible PrP genotypes succumb to experimental challenge with a sheep-passaged scrapie isolate (SSBP/1)*, J. Gen. Virol. 83: 1247–1250.
- Hunter N, J.D. Foster, W. Goldmann, M.J. Stear, J. Hope, C. Bostock – 1996. *Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs in specific PrP genotypes*. Arch. Virol. 141: 809-824.
- Hunter N. , D. Cairns, J. Foster, G. Smith, W. Goldmann, K. Donnelly – 1997. *Is scrapie a genetic disease? Evidence from scrapie-free countries*, Nature 386: 137.
- Hunter N. – 2007. *Scrapie—Uncertainties, biology and molecular approaches*. Biochimica et Biophysica Acta 1772: 619–628.

- Hunter N., W. Goldmann, J.D. Foster, D. Cairns and G. Smith – 1997. *Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep* Vet. Rec., 141, 137-140.
- Kao R.R., M.B. Gravenor, A.R. McLean – 2001. *Modelling the national scrapie eradication programme in the UK*. Math. Biosci. 174: 61–76.
- Keeling M.J, P. Rohani – 2008. *Modeling Infectious Diseases in Humans and Animals*. Princeton University Press.
- Kermack W.O. and A.G. McAndrick – 1927. *Contributions to the mathematical theory of epidemics I*. Proc. Royal Soc. London A 115: 700-721.
- Kermack W.O. and A.G. McAndrick – 1932. *Contributions to the mathematical theory of epidemics II*. Proc. Royal Soc. London A 138: 55-83.
- Kermack W.O. and A.G. McAndrick – 1933. *Contributions to the mathematical theory of epidemics III*. Proc. Royal Soc. London A 141: 94-122.
- Kimberlin R.H., Field H.J., Walker C.A. (1983): Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system; J Gen Virol, 64: 713-716.
- King C.Y. and R. Diaz-Avalos – 2004. *Protein-only trasmission of three yeast prion strains*. Nature 428: 319-323.
- Kitamoto T., R. Yi, S. Mohri, J. Tateishi - 1990. *Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob disease is influenced by the strain of the infectious agent*. Brain Res. 508: 165-167.
- Konold T., S. J. Moore, S. J Bellworthy and H.A. Simmons – 2008. *Evidence of scrapie transmission via milk*. BMC Veterinary Research 4:14.
- Jeffrey M., S. Martin, L. González, J. Foster, J.P. Langeveld, F.G. van Zijderveld, J. Grassi, N. Hunter. - 2006. *Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies*. J Comp Pathol. Feb-Apr;134(2-3):171-81.
- Lacroux C., F. Corbiere, G. Tabouret, S. Lugan, P. Costes, J. Mathey, J.M. Delmas, J.L. Weisbecker, G. Foucras, H. Cassard, J.M. Elsen, F. Schelcher, O. Andréoletti – 2007. *Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep*. J. Gen. Virol. 88: 1056-1061.
- Legname G., I.V. Baskakov, H.O. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner - 2004. *Synthetic mammalian prions*. Science 305: 673-676..
- Ligios C., E. Bandino, G. Di Guardo, G.C. Ferrari, M.G. Perfetti, C. Eleni, G. Ru, G. Miceli, G.P. Spanu, U. Agrimi, M. Pocchiari – 1999. *Scrapie della pecora: Osservazioni cliniche ed epidemiologiche in pecore di razza Sarda*; O&DV 1: 65-70.
- Maestrale C, A. Carta, S. Attene, A. Galistu, C. Santucciu, M.G. Cancedda, M. Saba, S. Sechi, C. Patta, E. Bandino, C. Ligios – 2009. *p.Asn176Lys and p.Met137Thr dimorphisms of the PRNP gene significantly decrease the susceptibility to classical scrapie in ARQ/ARQ sheep*. Anim Genet. Dec 40(6): 982-985.

- Man W.Y.N., N. Nicholls, M.E.J. Woolhouse, R.M. Lewis, B. Villanueva – 2009. *Evaluating different PrP genotype selection strategies for expected severity of scrapie outbreaks and genetic progress in performance in commercial sheep*. Prev. Vet. Med. 91: 161–171.
- Matthews L., M.E.J. Woolhouse, N. Hunter – 1999. *The basic reproduction number for scrapie*. Proc. R. Soc. Lond. B 266: 1085–1090.
- Matthews L., P.G. Coen, J.D. Foster, N. Hunter, M.E.J. Woolhouse – 2001. *Population dynamics of a scrapie outbreak*. Arch. Virol. 146: 1173–1186.
- McIntyre K.M., S. Gubbins, W. Goldmann, N. Hunter, M. Baylis – 2008. *Epidemiological characteristics of classical scrapie outbreaks in 30 sheep flocks in the United Kingdom*. PloS One 3: 3994.
- McIntyre K.M., H. Trewby, S. Gubbins, M. Baylis – 2010. *The impact of sheep breed on the risk of classical scrapie*. Epidemiol. Infect. 138: 384–392.
- Romolo N., E. Esposito, G. Vaccari, M. Conte, S. Marcon, M. Di Bari, C. Ligios, G. Di Guardo, U. Agrimi - 2003. *Molecular Analysis of Cases of Italian Sheep Scrapie and Comparison with Cases of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and Experimental BSE in Sheep*. Journal of Clinical Microbiology Sept. 2003, p. 4127–4133
- Oesch B., D. Westaway, M. Walchli, M.P. McKinley, S.B.H. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B. Prusiner, C. Weissmann 1985. *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. Cell 40: 735–746.
- Parry H.B. – 1960. *Scrapie: a transmissible hereditary disease of sheep*. Nature. 1960 Feb 13; 185(4711): 441–443.
- Pattison I.H. and G.C. Millson - 1961. *Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome*. J. Comp. Pathol. 71: 101–108.
- Pocchiari M. - 1994. *Prions and related neurological diseases*. Mol. Aspects Med. 15: 195–291.
- Prusiner S.B. – 1982. *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science 216: 136–144.
- Prusiner S.B., M.P. McKinley, K.A. Bowman, D.C. Bolton, P.E. Bendheim, D.F. Groth, G.G. Glenner - 1983. *Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods*. Cell 35: 349–358.
- Prusiner S.B. -1991. *Molecular biology of prion diseases*. Science 252: 1515–1522..
- Prusiner S.B. -1998. *Prions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 13363– 13383.
- Prusiner S.B. - 1999. *Prion biology and disease* (Ed. Stanley and B. Prusiner). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.



Race R., M. Oldstone, B. Chesebro – 2000. *Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal Scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen*. J. Virol. 74: 828-833.

Ryder S.J., G.A.H. Wells, J.M. Bradshaw, G.R. Pearson – 2001. *Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy*. Vet. Rec. 148: 437-441.

Ryder S., G. Dexter, S. Bellworthy, S. Tongue - 2004. *Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy*. Res Vet Sci. 2004 Jun;76(3):211-7.

Sakudo A., D.C. Lee, E. Yoshimura, S. Nagasaka, K. Nitta, K. Saeki, Y. Matsumoto, S. Lehmann, S. Itohara, S. Sakaguchi, T. Onodera – 2004. *Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313: 850-855.

Smith CB, C.J. Booth, J.A. Pedersen – 2011. *Fate of prions in soil: a review*. J Environ Qual. Mar-Apr 40(2): 449-461.

Sigurdsson B.– 1954. *Rida – a chronic encephalitis of sheep: with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics*. Br. Vet. J. 110:431-354

Sorenson J.R. – 2001. *Prion diseases: copper deficiency states associated with impaired nitrogen monoxide or carbon monoxide transduction and translocation*. J. Inorg. Biochem. 87: 125-127.

Stamp J.T. – 1962. *Scrapie: a transmissible disease of sheep*. Vet. Rec. 74: 357–362.

Tanaka M., P. Chien, N. Naber, R. Cooke, J.S. Weissman – 2004. *Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences*. Nature 428: 319-323.

Taylor D.M., I. McConnel, H. Fraser - 1996. *Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice*; J. Gen. Virol. 77: 1595-1599.

Telling GC, P. Parchi, S.J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, *et al.* – 1996. *Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity*. Science Dec 20, 274(5295): 2079-2082.

Tobler I. , S.E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P.A. McBride and J.C. Manson – 1996. *Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein*. Nature 380: 639-642.

Tongue S.C., D.U. Pfeiffer, R. Warner, H. Elliott and V. Del Rio Vilas – 2006. *Estimation of the relative risk of developing clinical scrapie: the role of prion protein (PrP) genotype and selection bias*. Vet. Rec. 158 (2): 43-50.

Tongue S.C., D.U. Pfeiffer, P.D. Shearn, J.W. Wilesmith – 2009. *PrP genotype: a flocklevel risk factor for scrapie?* Prev. Vet. Med. 92: 309-323.

Tongue S.C., J.W. Wilesmith, C.J. Cook – 2004. *Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie-affected flocks in Great Britain.* Vet. Rec. 2004 154: 9-16.

Tranulis M.A., A. Osland, B. Bratberg, M.J. Ulvund - 1999. *Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway.* J. Gen. Virol. 80: 1073-7.

Tranulis M. – 2002. *Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep.* APMIS 110: 33-43.

Truscott J.E. and N.M. Ferguson - 2008a. *Transmission dynamics and mechanisms of endemicity of scrapie in the UK sheep population.* Epidemiol. Infect. 137: 762–774.

Truscott J.E. and N.M. Ferguson - 2008b. *Control of scrapie in the UK sheep population.* Epidemiol. Infect. 137: 775–786.

Vaccari G., R. Petraroli, U. Agrimi, C. Eleni, M.G. Perfetti, M.A. Di Bari, L. Morelli, C. Ligios, L. Busani, R. Nonno and G. Di Guardo - 2001. *PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie.* Archives of Virology 146: 2029-2037.

Vaccari G., C. D'Agostino, R. Nonno, F. Rosone, M. Conte, M.A. Di Bari, B. Chiappini, E. Esposito, L. De Grossi, F. Giordani, S. Marcon, L. Morelli, R. Borroni, U. Agrimi – 2007. *Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy.* J. Virol. 81: 7306-7309.

Vaccari G. et al. – 2009. *Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP alleles against classical scrapie in Sarda breed sheep,* Vet. Res. 40: 19.

Wells G.A.H., A.C. Scott, C.T. Johnson, R.F. Gunning, R.D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, R. Bradley – 1987. *A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle;* Vet. Rec. 121: 419-420.

Woolhouse M.E.J., L. Matthews, P. Coen, S.M. Stringer, J.D. Foster, N. Hunter – 1999. *Population dynamics of scrapie in a sheep flock.* Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 354: 751–756.

Woolhouse M.E.J., P. Coen, L. Matthews, J.D. Foster, J.M. Elsen, R.M. Lewis, D.T. Haydon and N. Hunter – 2001. *A centuries-long epidemic of scrapie in British sheep?* Trends in Microbiology 9(2): 67-70.